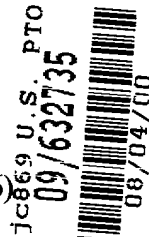


08-07-00



Box Patent Application
Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Attorney Docket No. RG0107US (#90236)



NEW APPLICATION TRANSMITTAL

Transmitted herewith for filing is the patent application of

Inventor(s): **Maria Isabel Baeza-Ramírez, José Leopoldo Aguilar-Faisal,
Carlos Wong-Ramírez, Miguel Angel Ibáñez-Hernández and
Monica Lara-Uc**

For: **METHODS FOR DIAGNOSTIC AND/OR TREATMENT OF
ANTIPHOSPHOLIPIDS ANTIBODIES-RELATED DISEASES, AND DEVICES**

1. Type of Application

This new application is for a(n) (check one applicable item below):

- (X) Original
- () Design
- () Plant
- () Divisional
- () Continuation
- () Continuation-in-part (CIP)

****NOTE:** If one of the following 3 items apply, then complete and attach added pages for new application transmittal where benefit of a prior U.S. application claimed.

CERTIFICATION UNDER 37 CFR 1.10

I hereby certify that this New Application Transmittal and the documents referred to as enclosed therein are being deposited with the United States Postal Service on the date noted below in an envelope as "Express Mail Post Office to Addressee" Mailing Label Number EK980729890US addressed: Box Patent Application, Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

Christine A. Kotran
(Type name of persons mailing paper)

Date August 4, 2000

6/2000/ck

Christine A. Kotran

2. Benefit of Prior U.S. Application(s) (35 USC 120)

NOTE: If the new application being transmitted is a divisional, continuation or a continuation-in-part of a parent case, or where the parent case is an International Application which designated the U.S., then check the following item and complete and attach ADDED PAGES FOR NEW APPLICATION TRANSMITTAL WHERE BENEFIT OR PRIOR U.S. APPLICATION(S) CLAIMED.

NOTE: **Each** paper or fee referred to as enclosed herein has the number of the "Express Mail" mailing label placed thereon prior to mailing. 37 CFR 1.10(b)

- ☐ The new application being transmitted claims the benefit of prior U.S. application(s) and enclosed are ADDED PAGES FOR NEW APPLICATION TRANSMITTAL WHERE BENEFIT OF PRIOR U.S. APPLICATION(S) CLAIMED.

3. Papers Enclosed Which are Required For Filing Date Under 37 CFR 1.53(b) (Regular) or 37 CFR 1.153 (Design) Application

- (X) 56 Pages of specification (**Spanish language text**)
(X) 4 Pages of claims (31 claims)
(X) 1 Pages of Abstract
(X) 17 Sheets of drawing
 ☐ formal
 (X) informal

4. Additional papers enclosed

- ☐ Preliminary Amendment
☐ Information Disclosure Statement
☐ Form PTO-1449
☐ Citations
☐ Declaration of Biological Deposit
☐ Special Comments
☐ Other

5. Declaration or oath

- ☐ Enclosed
 executed by (check **all** applicable boxes)
 ☐ inventor(s).
 ☐ legal representative of inventor(s). 37 CFR 1.42 or 1.43

- ☐ joint inventor or person showing a proprietary interest on behalf of inventor who refused to sign or cannot be reached.
- ☐ this is the petition required by 37 CFR 1.47 and the statement required by 37 CFR 1.47 is also attached. See item 12 below for fee.
- ☒ Not Enclosed.
- ☐ Application is made by a person authorized under 37 CFR 1.41(c) on behalf of all the above named inventor(s). The declaration or oath, along with the surcharge required by 37 CFR 1.16(e) can be filed subsequently.
- ☐ Showing that the filing is authorized. (Not required unless called into question. 37 CFR 1.41(d).

6. Inventorship Statement

WARNING: If the named inventors are each not the inventors of all the claims an explanation, including the ownership of the various claims at the time the last claimed invention was made, should be submitted.

The inventorship for all the claims in this application are:

- ☒ The same
- or**
- ☐ Are not the same. An explanation, including the ownership of the various claims at the time the last claimed invention was made,
- ☐ is submitted
 - ☐ will be submitted.

7. Language

NOTE: An application including a signed oath or declaration may be filed in a language other than English. A verified English translation of the non-English language application and the processing fee of \$130.00 required by 37 CFR 1.17(k) is required to be filed with the application or within such time as may be set by the Office. 37 CFR 1.52(d).

NOTE: A non-English oath or declaration in the form provided or approved by the PTO need not be translated. 37 CFR 1.69(b).

- ☐ English
- ☒ Non-English (**Spanish language text**)
- ☐ the attached translation is a verified translation. 37 CFR 1.52(d).

8. Assignment

- (X) An assignment of the invention to: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del
Instituto Politécnico Nacional
() is attached (with separate transmittal)
(X) will follow

9. Certified Copy

Certified copy(ies) of application(s)

_____	_____	_____
(country)	(appl. no.)	(filed)

_____	_____	_____
(country)	(appl. no.)	(filed)

_____	_____	_____
(country)	(appl. no.)	(filed)

from which priority is claimed

- () is (are) attached
() will follow

NOTE: The foreign application forming the basis for the claim for priority **must** be referred to in the **oath** or **declaration**. 37 CFR 1.55(a) and 1.63.

NOTE: This item is for any foreign priority for which the application being filed directly relates. if any parent U.S. application or International Application form which this application claims benefit under 35 U.S.C. 120 is itself entitled to priority from a prior foreign application then complete item 17 on the ADDED PAGES FOR NEW APPLICATION TRANSMITTAL WHERE BENEFIT OR PRIOR U.S. APPLICATION(S) CLAIMED.

10. Fee Calculation

A. (X) Regular application

CLAIMS AS FILED			
Number Filed	Number Extra	Rate	Basic Fee \$690.00
Total Claims	-20 =	---	X \$18.00 =
Independent Claims	- 3 =	---	X \$78.00 =

Multiple dependent claim(s), if any X \$260.00 =

- ☐ Amendment canceling extra claims enclosed
- ☐ Amendment deleting multiple dependencies enclosed
- ☒ Fee for extra claims is not being paid at this time

NOTE: If the fees for extra claims are not paid on filing they must be paid or the claims canceled by amendment, prior to the expiration of the time period set for response by the Patent and Trademark Office in any notice of fee deficiency. 37 CFR 1.16(d).

Filing Fee Calculation \$690.00

B. () Design application

(\$310.00 - 37 CFR 1.16(f))

Filing Fee Calculation \$

11. Small Entity Statement(s)

- ☐ Verified Statement(s) that this is a filing by a small entity under 37 CFR 1.9 and 1.27 is(are) attached.

Filing Fee Calculation (50% of A or B above) \$

NOTE: Any excess of the full fee paid will be refunded if a verified statement and a refund request are filed within 2 months of the date of timely payment of a full fee. 37 CFR 1.28(a).

12. Fee Payment Being Made At This Time

- ☐ Not Enclosed
☐ No filing fee is to be paid at this time. (This and the surcharge required by 37 CFR 1.16(e) can be paid subsequently.)
☒ Enclosed
- | | |
|--|------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> basic filing fee | \$690.00 |
| <input type="checkbox"/> recording assignment
(\$40.00; 37 CFR 1.21(h)(1)) | \$ |
| <input type="checkbox"/> petition fee for filing by
other than all the inventors
or person on behalf of the
inventor where inventor refused
to sign or cannot be reached.
(\$130.00; 37 CFR 1.47 & 1.17(h)) | \$ |
| <input type="checkbox"/> for processing an application
with a specification in a
non-English language. (\$130.00
37 CFR 1.52(d) and 1.17(k)) | \$ |
| <input type="checkbox"/> processing and retention fee
(\$130.00; 37 CFR 1.53(d) and
1.21(l)) | \$ |
| Total fees enclosed | <u>\$690.00</u> |

13. Method of Payment of Fees

- ☒ Check in the amount of **\$690.00**
☐ Charge Account No. 08-2441 in the amount of \$
A duplicate of this transmittal is attached.

NOTE: Fees should be itemized in such a manner that it is clear for which purpose the fees are paid. 37 CFR 1.22(b).

14. Authorization to Charge Additional Fees

WARNING: If no fees are to be paid on filing the following items should **not** be completed.

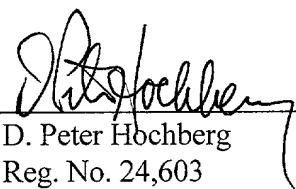
WARNING: Accurately count claims, especially multiple dependent claims, to avoid unexpected high charges, if extra claim charges are authorized.

- (X) The Commissioner is hereby authorized to charge the following additional fees required by this paper and during the entire pendency of this application to Deposit Account No. 08-2441.
- (X) 37 CFR 1.16 (filing fees)
 - (X) 37 CFR 1.16 (presentation of extra claims)
 - (X) 37 CFR 1.16(e) (surcharge for filing the basic filing fee and/or declaration on a date later than the filing date of the application)
 - (X) 37 CFR 1.17 (application processing fees)
 - () 37 CFR 1.18 (issue fee at or before mailing Notice of Allowance, pursuant to 37 CFR 1.311(b)).

15. Instruction As To Overpayment

- () Credit Account No. 08-2441. This transmittal is submitted in duplicate.
- (X) **Refund** directly to the undersigned, **specifically identifying our Docket No. RG0107US.**

Respectfully submitted,

By: 
D. Peter Hochberg
Reg. No. 24,603

DPH/ck
Enc.

D. Peter Hochberg Co., L.P.A.
1940 East 6th Street - 6th Floor
Cleveland, Ohio 44114-2294
(216) 771-3800

() Incorporation by reference of added pages

Check the following item if the application in this transmittal claims the benefit of prior U.S. application(s) (including an international application entering the U.S. stage as a continuation, divisional or C-I-P application) and complete and attached the ADDED PAGES FOR NEW APPLICATION TRANSMITTAL WHERE BENEFIT OF PRIOR U.S. APPLICATION(S) CLAIMED.

- () Plus Added Pages For New Application Transmittal Wherein
Benefit Of Prior U.S. Application(s) Claimed

Number of pages added _____

- () Plus Added Pages For Papers Referred To In Item 4 Above

Number of pages added _____

(X) Statement Where No Further Pages Added

If no further pages from a part of this Transmittal then end this Transmittal with this page and check the following item

- (X) This transmittal ends with this page.

MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y/O TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS, Y DISPOSITIVOS UTILIZADOS.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con la obtención de anticuerpos que reconocen lípidos y, más particularmente, se relaciona con la obtención de anticuerpos contra estructuras lipídicas diferentes a la bicapa, y al uso de los mismos para el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades; así como para la determinación de estados fisiológicos celulares.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Existen en el estado de la técnica diversos estudios en los que se puede encontrar evidencia de anticuerpos que reconocen lípidos.

Por ejemplo, se han detectado en el suero de enfermos del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, como lo describieron Asherson y col. en su libro "El Síndrome Antifosfolípido" en 1996 (CRC Press, Boca Raton). De igual manera, se han obtenido en animales que fueron tratados experimentalmente con lípidos por inmunización activa, de acuerdo con lo descrito por Alving en 1992 (*Biochim. Biophys. Acta* 1113:307-322), o bien, en animales que recibieron anticuerpos antifosfolípidos por inmunización pasiva, como lo describieron Tincani y Shoenfeld en 1996 en el libro arriba mencionado.

Los anticuerpos anti-lípidos se han clasificado en dos grupos de acuerdo con el método que se emplea para su determinación. Estos grupos son anticuerpos anti-cardiolipina y anticuerpos anti-coagulantes (Guglielmone y Fernandez, 1998, *J. Rheumatol.* 26:86-90).

Los anticuerpos anti-cardiolipina se detectan por métodos en donde el antígeno lipídico, la cardiolipina, es inmovilizado en una fase sólida, según lo describieron Harris y col. en 1985 (*Clin. Rheum. Dis.* 11:591-609), como pueden ser por ejemplo los ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas y los ensayos de inmunoanálisis que emplean anticuerpos radiactivos, mejor conocidos por sus siglas en inglés respectivamente como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) y RIA (radioimmuno assay), los cuales han sido ampliamente utilizados en la técnica anterior.

Por lo que se refiere a los anticuerpos anti-coagulantes, éstos se detectan por métodos en los que se mide *in vitro* un aumento en el tiempo de coagulación de muestras de plasma sanguíneo, de acuerdo con lo establecido por Bevers y col. en 1991 (*Thromb. Haemost.* 66:629-632), como los métodos de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), de tiempo de coagulación de Russell, de proteína C y de proteína S, entre otros. En estas pruebas, los anticuerpos anticoagulantes se unen al lípido fosfatidiletanolamina o a fosfatidilserina, que es el factor intermediario en la cascada de la coagulación, por lo que al disminuir la concentración de este lípido, por la reacción inmune, se aumenta el tiempo en que ocurre dicha coagulación.

Por lo que se refiere a los anticuerpos anti-cardiolipina, éstos tienen la desventaja de que dan reacción cruzada con otros lípidos aniónicos como la fosfatidilserina y el fosfatidilglicerol. Debido a esta falta de especificidad por un tipo de lípido, a los anticuerpos antes mencionados en general se les conoce como anticuerpos antifosfolípidos.

5 También se han detectado anticuerpos contra fosfatidiletanolamina en el suero de enfermos del síndrome de antifosfolípidos, así como contra fosfatidilcolina en enfermos que presentan anemia hemolítica, como lo describieron Sugi y McIntyre (*Blood* 86:3083-3089) y Arvieux y col. (*Thromb. Haemost.* 74:1120-1125), respectivamente, en 1995.

10 Por otra parte, algunos estudios han demostrado que la unión de los anticuerpos antifosfolípidos al antígeno lipídico aumenta en presencia de una proteína plasmática. Por ejemplo, en 1990, McNeil y col. determinaron que la unión de anticuerpos a la cardiolipina aumenta en presencia de la β_2 -glicoproteína o apoproteína H (*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87:4120-4124).

Adicionalmente, algunos anticuerpos anti-cardiolipina se unen directamente a β_2 -glicoproteína, como lo describieron Roubey y col. en 1995 (*J. Immunol.* 154:954-960).

15 Lo anterior sugiere que los anticuerpos anti-cardiolipina pueden reconocer un epítipo en la β_2 -glicoproteína que se expone en el complejo β_2 -glicoproteína-cardiolipina, y que también se unen directamente con la β_2 -glicoproteína, pero con muy baja especificidad, de acuerdo con Pengo y col. (1995, *Thromb. Haemost.* 73:29-34).

20 De acuerdo con los diversos estudios realizados, se puede concluir que la unión de anticuerpos antifosfolípidos con antígenos lipídicos también está asociada con proteínas. Sugi y McIntyre (*op.cit.*, 1995) encontraron que las proteínas llamadas cininógenos están involucradas en la unión de los anticuerpos a la fosfatidiletanolamina, mientras que las proteínas que se unen a la fosfatidilserina, tales como protrombina, proteína C, proteína S y anexina V, han sido implicadas en la unión de anticuerpos anti-coagulantes, según lo establecido en 1994 por Nakamura y col. 25 (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205:1488-1493), así como por Roubey (*Blood* 84:2854-2867). Estos estudios indican que el antígeno de algunos anticuerpos antifosfolípidos es realmente un complejo formado por fosfolípidos y proteínas específicas. Sin embargo, en otros estudios se han identificado anticuerpos anti-cardiolipina que no requieren de β_2 -glicoproteína en su reacción con la cardiolipina por el método de ELISA. Tales estudios fueron realizados por McNeil y sus 30 colaboradores en 1989 (*Br. J. Haematol.* 73:506-513), así como por Pengo y Biasiolo en 1993 (*Thromb. Res.* 72:423-430).

35 Por otra parte, algunos anticuerpos anti-cardiolipina, purificados por cromatografía de afinidad, no presentan actividad anticoagulante (McNeil y col., *op. cit.*, 1989; Shi y col. 1993, *Blood* 81:1255-1262), aunque otros estudios han demostrado que ambos tipos de anticuerpos son removidos por absorción con cardiolipina (Pengo y Biasiolo, *op. cit.*, 1993; Pierangeli y col. 1993, *Br. J. Haematol.* 85:124-132).

Por otra parte en los estudios en animales de experimentación, tratados por inmunización activa o pasiva, se aplican los métodos de detección de anticuerpos antifosfolípidos que se han descrito para el humano. Además, en estos modelos animales se han analizado los diferentes órganos y tejidos por estudios anatómicos, histopatológicos, de inmunofluorescencia, e incluso de pérdida fetal y consecuentemente se han estudiado las lesiones producidas en los fetos y en la placenta de los animales, hembras, en estudio. Trabajos de este tipo han sido realizados por Tincani y Shoenfeld (*op. cit.* 1996) así como por Shoenfeld y Ziporen (*Lupus* 7:S158-S161, 1998).

En general de los estudios anteriormente mencionados, se puede observar que los anticuerpos antifosfolípidos que se han descrito en enfermos humanos y en animales de experimentación, tienen una especificidad hacia los antígenos lipídicos muy variada, lo cual podría atribuirse entre otras causas a la falta de especificidad de los métodos de detección de dichos anticuerpos.

En tales métodos, no se ha considerado la estructura y la asociación molecular, así como las propiedades químicas que tienen los antígenos lipídicos en la naturaleza. Por consecuencia, en los antígenos lipídicos que se han utilizado, los fosfolípidos se encuentran unidos a soportes sólidos artificiales como en los casos de ELISA y RIA, o bien, en una asociación molecular que no está caracterizada completamente, como en las pruebas de aumento del tiempo de coagulación.

Existen muy pocos estudios en los que se ha considerado la estructura molecular de los fosfolípidos al emplearlos como antígenos. Por ejemplo, los trabajos de Rauch y col. de 1989 y 1998 (*Thromb. Haemost.* 62:892-896 y *Thromb. Haemost.* 80:936-941, respectivamente) y de Berard y col. (*J. Lab. Clin. Med.*, 1993, 122:601-605), encontraron que el suero de algunos enfermos con lupus eritematoso generalizado es inhibido en su actividad anti-coagulante por la fosfatidiletanolamina asociada en la fase tubular H_{II} y que esta inhibición no se presentó cuando el fosfolípido se encontraba asociado en bicapa. Sin embargo, las propiedades de la membrana celular no se pueden relacionar con las de los fosfolípidos asociados en forma tubular, porque la asociación lipídica tubular H_{II} , es prácticamente incompatible con la estructura vesicular de la membrana celular, como lo han establecido diversos autores. Es decir, en los antígenos lipídicos empleados en estos estudios, los fosfolípidos se encuentran en una forma molecular que no corresponde a la que se encuentra en las membranas celulares.

Adicionalmente, es conocido que la estructura molecular de la membrana plasmática de células de mamíferos es de un heteropolímero de asociación, formado por fosfolípidos, glicolípidos, colesterol, proteínas y glicoproteínas, en donde los lípidos se encuentran principalmente en la asociación molecular de bicapa. Sin embargo, también se conoce que los lípidos pueden tener una asociación molecular diferente a la bicapa, y que dicha asociación depende de la geometría molecular de los lípidos y de las condiciones del medio en las que se encuentren los mismos.

Los lípidos de forma molecular cilíndrica, como el fosfatidato, el fosfatidilglicerol, el fosfatidilinositol, la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina, la cardiolipina, la esfingomielina y los diglucosildiacilglicéridos, se asocian *in vitro* en un medio acuoso en bicapas cerradas, o liposomas, y constituyen del 60 al 70% de los lípidos membranales.

5 Por otra parte, los lípidos de forma molecular cónica, como la fosfatidiletanolamina, los monoglicosildiacilglicéridos y el diacilglicerol, así como los lípidos antes mencionados: fosfatidato, cardiolipina, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol pero en presencia de cationes divalentes, se ensamblan en la fase conocida como H_{II}, es decir, en cilindros empacados hexagonalmente; mientras que los lípidos en forma de cono invertido, como los lisofosfolípidos y
10 los gangliósidos, se asocian en micelas. Los lípidos de forma cónica y de cono invertido, representan del 30 al 40% de los lípidos membranales.

Las estructuras lipídicas H_{II} y micelar, así como cualquier otro arreglo estructural de los lípidos que no forme una bicapa pero que se encuentre inmerso en una bicapa, se consideran, para los fines de la presente invención, como estructuras lipídicas diferentes a la bicapa, o bien, como
15 partículas lipídicas, independientemente de la naturaleza de los lípidos que las forman.

De igual manera, es conocido que en presencia de cationes divalentes, de fármacos como la cloropromacina y la procainamida, de péptidos no-polares, de proteínas tales como la del bacteriófago M13, del colesterol, de iones lantano, así como de cambios en la temperatura y el pH, los lípidos cónicos forman asociaciones moleculares diferentes a la bicapa. Estas asociaciones
20 lipídicas son de naturaleza transitoria, porque cuando disminuye la concentración de los compuestos que inducen su formación, o cuando disminuye la temperatura o vuelve a cambiar el pH, los lípidos cónicos regresan a la asociación de bicapa, según lo describieron Cullis y col. en 1991 (*Membrane Fusion. Marcel Dekker, New York*), Baeza y col. en 1995 (*Biochem. Cell Biol.* 73:289-297) y Aguilar y col. en 1999 (*J. Biol. Chem.* 274:25193-25196). La asociación molecular
25 de lípidos en bicapa se observa como una superficie lisa en análisis de criofractura.

Los lípidos en general son moléculas poco inmunogénicas, y de las dos asociaciones moleculares que pueden presentar los lípidos en las membranas, se considera que la de bicapa será la menos inmunogénica porque es la que constituye principalmente la matriz membranar.

Sin embargo, se sabe que las estructuras lipídicas diferentes a la bicapa, estabilizadas con
30 cationes divalentes, que se observan como protuberancias sobre la superficie lisa de la bicapa en análisis de criofractura, inducen la formación de anticuerpos que reconocen a los lípidos asociados en partículas lipídicas y no reaccionan con lípidos en bicapa.

En relación con lo anterior, Baeza y sus colaboradores en 1995 (*op. cit.*), reportaron la elaboración de liposomas con arreglos estructurales lipídicos diferentes a la bicapa, o partículas
35 lipídicas, así como una actividad antigénica de los mismos al obtener anticuerpos policlonales. Por medio de análisis citofluorométricos de la reacción inmune se pudo identificar la presencia de

partículas lipídicas en los liposomas ahí descritos, utilizando para ello anticuerpos policlonales anti-partículas lipídicas obtenidos de sueros de ratones.

A este respecto, la inmunización de los ratones se realizó mediante la introducción de partículas lipídicas formadas artificialmente, de forma que un exceso de partículas lipídicas provocara la reacción inmune deseada. Hasta la fecha, se cree que las asociaciones moleculares diferentes a la bicapa o partículas lipídicas, también serían poco inmunogénicas cuando se encuentren presentes en la naturaleza, por ejemplo en células de humanos y animales, debido a que son transitorias y por ello no serían detectadas por el sistema inmunitario.

Adicionalmente, del análisis del conjunto de los estudios arriba mencionados, se puede observar que la cardiolipina es el único lípido que por sí mismo ha podido reaccionar con anticuerpos presentes en pacientes con el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos o enfermedades relacionadas con el mismo, y que los fosfolípidos normalmente presentes en la membrana celular arriba mencionados, requieren estar relacionados con proteínas o de estar asociados en un arreglo molecular lipídico incompatible con la membrana celular para reaccionar con los anticuerpos de dichos pacientes, a excepción de los estudios de Baeza y col. (*op. cit.* 1995) sobre los anticuerpos anti-partículas lipídicas que reaccionan con un arreglo molecular lipídico similar al que se ha descrito en las membranas celulares.

A este respecto, la presencia en sueros de pacientes con el síndrome de antifosfolípidos de anticuerpos anti-cardiolipina, un lípido mitocondrial, de anticuerpos anti-nucleares y de anticuerpos anti-ADN, es indicativo de la existencia de eventos previos que causan daño inmunológico en las membranas, con el rompimiento de las células y la exposición de los componentes intracelulares al sistema inmunitario, provocando la reacción inmunológica correspondiente que contribuye al desarrollo del síndrome. Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios que permitan determinar cuales son los eventos que provocan el rompimiento de la membrana celular. En otras palabras, con los conocimientos existentes hasta la fecha es imposible detectar los anticuerpos anti-cardiolipina, anti-nucleares o anti-DNA antes de que se haya provocado el daño a la célula, impidiendo un diagnóstico y tratamiento temprano de las enfermedades relacionadas con el síndrome.

A este respecto, en la tesis presentada por J. Leopoldo Aguilar F. el 17 de diciembre de 1997 ("*Determinación de asociaciones lipídicas de no-bicapa en liposomas y membranas celulares con anticuerpos monoclonales*", Tesis Doctoral, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional) se analizaron 5 sueros de pacientes que presentaban síndrome de antifosfolípidos primario y 5 sueros de pacientes que presentaban lupus eritematoso generalizado, lo cual se corroboró por las características clínicas que presentaron los pacientes, y mediante la detección de anticuerpos anti-cardiolipina, y de anticuerpos anti-nucleares, estos últimos en el caso de los enfermos con lupus. Los sueros de los pacientes analizados también presentaron anticuerpos

anti-partículas lipídicas, detectados conforme a las técnicas de ELISA-liposomal y de citofluorometría liposomal ahí descritas.

Desgraciadamente, este descubrimiento no aporta alguna ventaja en cuanto a la detección temprana de las enfermedades, ya que la presencia de anticuerpos antifosfolípidos y de los anticuerpos anti-partículas lipídicas en esos pacientes se puede explicar de acuerdo con dos hipótesis.

La primera, es que un factor desconocido, provoca la destrucción de la membrana celular, lo cual promueve la formación de partículas lipídicas a partir de los lípidos membranales que entran en contacto con el sistema inmunitario junto con los componentes intracelulares, con la consecuente formación de manera simultánea de anticuerpos anti-partículas lipídicas, anti-cardiolipina y anti-nucleares.

La segunda hipótesis, consiste en suponer que las partículas lipídicas se forman en la membrana celular antes de su destrucción, por lo que se formarían anticuerpos anti-partículas lipídicas que destruirían la membrana, exponiendo a los componentes celulares al sistema inmunitario y dando lugar posteriormente a la formación de anticuerpos anti-cardiolipina y anti-nucleares.

Hasta la fecha, ninguna de las dos hipótesis ha sido demostrada, lo cual es de suma importancia para el tratamiento, ya que de ser cierta la segunda hipótesis, sería posible detectar las enfermedades arriba mencionadas en etapas tempranas, e inclusive, sería posible inhibirlas.

Por consecuencia de lo anterior, se ha buscado suprimir los inconvenientes de las técnicas de inducción y de detección de anticuerpos antifosfolípidos provocados por la estructura y asociación molecular de los antígenos empleados en las mismas, mediante el empleo de antígenos lipídicos con una estructura y asociación molecular semejante a la que se encuentra en pacientes con enfermedades relacionadas con anticuerpos antifosfolípidos, para la inducción y detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas que permitan un diagnóstico temprano de dichas enfermedades, así como para la determinación de estados fisiológicos celulares, como la apoptosis, o muerte celular programada (Pittoni y Isenberg, 1998, *Semin. Arthritis. Rheum.* 28:163-178), y los que se presentan en el ciclo celular (Go, G1, G2 y M), entre otros.

OBJETIVOS DE LA INVENCION

Teniendo en cuenta las deficiencias en la estructura y en la asociación molecular de los antígenos que se emplean en las técnicas de inducción y de detección de anticuerpos antifosfolípidos de los métodos de la técnica anterior, uno de los objetos de la presente invención consiste en emplear antígenos lipídicos, con una estructura y asociación molecular semejante a la que se encuentra en pacientes con enfermedades relacionadas con anticuerpos antifosfolípidos, con el propósito de proveer un método para la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas.

Es otro objeto de la presente invención, proveer un método de diagnóstico que utiliza anticuerpos monoclonales específicos a antígenos lipídicos, que respondan de igual manera que los anticuerpos anti-partículas lipídicas presentes en sueros de pacientes con diversas enfermedades relacionadas con anticuerpos antifosfolípidos, con el fin de diseñar una estrategia de tratamiento de dichos pacientes contra tales enfermedades.

Es un objeto adicional de la presente invención, proveer un kit o equipo de diagnóstico para la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en etapas tempranas de enfermedades que presentan tales anticuerpos en animales y en humanos.

Es otro objeto de la presente invención, proveer un kit o equipo de diagnóstico para la detección de partículas lipídicas en las membranas de las células de sujetos enfermos, humanos o animales, que presenten anticuerpos anti-partículas lipídicas.

Es todavía un objeto más de la presente invención, proveer un método para la prevención, curación o mejoramiento de tales enfermedades mediante la inhibición o el bloqueo de anticuerpos anti-partículas lipídicas.

Aún otro objeto de la presente invención consiste en proveer un método para la prevención, curación o mejoramiento de tales enfermedades, mediante la estabilización de membranas celulares, que impida la formación de partículas lipídicas y por lo tanto la formación posterior de anticuerpos anti-partículas lipídicas.

Un objeto adicional de la presente invención consiste en proveer métodos y sus correspondientes kits para la detección de los diferentes estados fisiológicos que pueden presentar las células, lo cual puede conducir a la prevención de enfermedades relacionadas con anticuerpos antifosfolípidos.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS.

La Figura 1 muestra las gráficas de barras del análisis por ELISA liposomal, de la reacción de los sueros control de humanos sanos donadores del banco de sangre y de enfermos con el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, con antígenos liposomales de fosfatidilcolina:fosfatidato [PC:PA] (relación molar 2:1) que llevan partículas lipídicas inducidas por calcio. Además, se indica la reacción del anticuerpo monoclonal H308 con dichos antígenos.

Las Figuras 2A y 2B ilustran las gráficas de la fluorescencia de liposomas de PC:PA (relación molar 2:1), con y sin partículas lipídicas inducidas por calcio, que se incubaron con Tris-NaCl o con el segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa.

Las Figuras 3A-3I muestran las gráficas del análisis citofluorométrico, de la reacción del anticuerpo monoclonal H308 con antígenos liposomales de PC:PA (relación molar 2:1) y de dipalmitoilfosfatidilcolina:fosfatidilcolina de yema de huevo:dipalmitoil-fosfatidato [DPPC:PC:DPPA] (relación molar 1.2:0.8:1), así como del análisis correspondiente a los antígenos

liposomales de PC:PA (relación molar 2:1) en Tris-NaCl (10 mM, 1 mM) con o sin partículas lipídicas inducidas por calcio.

Las Figuras 4A-4X muestran las gráficas del análisis citofluorométrico, de la reacción de los sueros de humanos sanos donadores del banco de sangre y de enfermos con el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, con antígenos liposomales de PC:PA (relación molar 2:1) que llevan partículas lipídicas inducidas por calcio.

Las Figuras 5A-5C muestran las gráficas del análisis citofluorométrico, que indica que el suero AC15 de un paciente con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario no presenta inmunorreacción con los antígenos liposomales de DPPC:PC:DDPA (relación molar 1.2:0.8:1) que carecen de partículas lipídicas.

La Figura 6 es una fotografía de un cultivo de células C5337 de cáncer de páncreas humano, que muestra (flechas 1 a 3) la inmunorreacción del anticuerpo monoclonal H308 con las partículas lipídicas de las membranas de estas células.

La Figura 7 ilustra las gráficas de barras del análisis por ELISA liposomal, de la reacción de los sueros de enfermos con el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos con células C5337 de cáncer de páncreas, los sueros se usaron adsorbidos y sin adsorber con los antígenos liposomales de PC:PA (relación molar 2:1) que llevan partículas lipídicas inducidas por calcio.

Las Figuras 8A-8F muestran las gráficas de fluorescencia liposomal y de complejidad de la bicapa liposomal, que analizan la reacción de los sueros de los ratones BALB/c antes y después de que se inmunizaron con antígenos liposomales de PC:PA (relación molar 2:1) que llevan partículas lipídicas inducidas por manganeso. Para detectar la reacción inmune se usaron como antígenos los mismos liposomas.

Las Figuras 9A-9F muestran las gráficas de agregación liposomal y de complejidad de la bicapa liposomal, que analizan la reacción de los sueros de los ratones BALB/c antes y después de que se inmunizaron con antígenos liposomales de PC:PA (relación molar 2:1) que llevan partículas lipídicas inducidas por manganeso. Para detectar la reacción inmune se usaron como antígenos los mismos liposomas.

Las Figuras 10A-10F muestran las gráficas de fluorescencia liposomal y de complejidad de la bicapa liposomal, que analizan la reacción de los sueros de los ratones BALB/c antes y después de que se inmunizaron con antígenos liposomales de PC:PA (relación molar 2:1) que llevan partículas lipídicas inducidas por procainamida. Para detectar la reacción inmune se usaron como antígenos los mismos liposomas.

La Figura 11 es una fotografía de un ratón BALB/c hembra de siete meses de edad, que fue tratado con 3 mg/Kg de peso del fármaco inductor de partículas lipídicas cloropromacina, en donde se observa alopecia y lesiones en la cara en forma de ala de mariposa.

Las Figuras 12A-12I son las gráficas del análisis citofluorométrico, de la reacción de los sueros de los ratones BALB/c antes y después de que se trataron por vía intramuscular cada 24 hs durante dos meses con 3 mg/Kg de peso del fármaco inductor de partículas lipídicas procainamida. Para detectar la reacción inmune se usaron como antígenos liposomas de PC:PA (relación molar 2:1) que llevan partículas lipídicas inducidas por procainamida.

La Figura 13 ilustra esquemas de la estructura química de los haptenos fosforilcolina, glicerolfosforilcolina, fosforilserina, glicerolfosforilserina y fosforiletanolamina que se emplean en la inhibición de los anticuerpos anti-partículas lipídicas.

La Figura 14 ilustra las gráficas de la inhibición de la inmunorreacción del anticuerpo monoclonal H308, con los haptenos fosforilcolina, glicerolfosforilcolina, fosforilserina, glicerolfosforilserina y fosforiletanolamina y de la reacción del anticuerpo monoclonal H308 con los liposomas de fosfatidilcolina.

La Figura 15 es un esquema de la asociación de los lípidos en el arreglo molecular de bicapa y de micela invertida insertada en una bicapa lipídica abierta, que constituyen en conjunto la partícula lipídica. Las flechas indican los diferentes arreglos moleculares lipídicos.

Las Figuras 16A-16H ilustra las gráficas de agregación liposomal y de complejidad de la bicapa liposomal, que analizan la estabilización de las bicapas lipídicas de los antígenos liposomales de PC:PA (relación molar 2:1) que se trataron con los fármacos inductores de partículas lipídicas clorpromacina o procainamida y/o los fármacos estabilizadores de la bicapa lipídica cloroquina o espermidina.

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

No obstante la naturaleza transitoria de las partículas lipídicas en las membranas celulares activas, se ha encontrado sorprendentemente que los sueros de los pacientes que presentan enfermedades relacionadas con el síndrome de antifosfolípidos reaccionan con células C5337 de cáncer de páncreas, lo cual es indicativo de una presencia prolongada de partículas lipídicas en las membranas celulares de dichos pacientes.

Igualmente, se ha encontrado sorprendentemente mediante estudios en ratones, que al introducir un antígeno que contiene partículas lipídicas en ratones BALB/c, dichos ratones presentaron alopecia y lesiones en ala de mariposa semejantes a las descritas para algunas enfermedades autoinmunes, así como depósitos de complejos inmunes y alteraciones patológicas en diferentes órganos. Adicionalmente, se ha encontrado que dichos ratones desarrollaron primeramente anticuerpos anti-partículas lipídicas y posteriormente anticuerpos anti-cardiolipina, anti-coagulante lúpico y anti-nucleares, lo cual confirma que los anticuerpos anti-partículas lipídicas constituyen la primera etapa en el desarrollo de enfermedades relacionadas con anticuerpos antifosfolípidos.

De conformidad con lo anterior, la presencia de anticuerpos anti-partículas lipídicas en una de la primeras etapas de la enfermedad, indica que uno de los primeros eventos que ocurren en el síndrome de antifosfolípidos es la formación de anticuerpos anti-partículas lipídicas. Estos anticuerpos al reaccionar con las partículas lipídicas en las membranas celulares, causan daño en las membranas, con el rompimiento de las células y la exposición de los componentes intracelulares al sistema inmunitario; lo cual explica la presencia posterior de anticuerpos anti-cardiolipina, un lípido mitocondrial, anticuerpos anti-nucleares y anticuerpos anti-DNA, que se han descrito en dichas enfermedades en el humano.

Para los fines de la presente invención, se entiende por "enfermedad relacionada con anticuerpos antifosfolípidos" a cualquier enfermedad que presente anticuerpos antifosfolípidos en cualquier etapa de desarrollo. Algunas de tales enfermedades se mencionan a continuación, de manera enunciativa, más no limitativa: síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario o secundario; en este último caso, asociado con enfermedades autoinmunes tales como la vasculitis, la artritis reumatoide y el lupus eritematoso generalizado; enfermedades que provocan un aumento en la división celular, como pueden ser neoplasias del tipo del carcinoma en el hígado o en el ovario, linfomas, leucemias o desórdenes mieloproliferativos; infecciones virales como la mononucleosis infecciosa y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida; enfermedades producidas por bacterias, como la sífilis; y, enfermedades producidas por protozoarios como la malaria.

Adicionalmente, la presencia de anticuerpos antifosfolípidos se ha relacionado con el infarto al miocardio y la senectud.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es proveer de un método de diagnóstico a través del cual se determina si un sujeto que presenta alguna de las características clínicas del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario (ver Tabla 1), entre las principales se encuentran: trombosis venosa, trombosis arterial, trombocitopenia o pérdida fetal recurrente; o de las enfermedades asociadas al síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario (Tabla 1) y que aún no presenta anticuerpos anti-cardiolipina, anti-coagulante lúpico, anti-DNA o anti-nucleares, tiene una enfermedad relacionada con la presencia de anticuerpos antifosfolípidos; en donde dicho método comprende detectar de manera directa o indirecta la presencia o ausencia de partículas lipídicas en una muestra del sujeto; y observar si las partículas lipídicas son o no detectadas, en donde la presencia de las partículas lipídicas indica que el sujeto está desarrollando una enfermedad relacionada con la presencia de anticuerpos antifosfolípidos.

En una modalidad preferida, la detección de las partículas lipídicas se realiza de manera indirecta, mediante el uso de un antígeno que contiene partículas lipídicas que se hace reaccionar con suero del sujeto con la finalidad de determinar si en dicho suero existen anticuerpos anti-partículas lipídicas, tal determinación realizándose preferiblemente mediante el uso de por lo menos una técnica seleccionada entre citofluorometría, inmunofluorescencia y ELISA.

En una modalidad específica, el antígeno que contiene partículas lipídicas se selecciona entre células neoplásicas y liposomas, en donde los liposomas se forman a partir de por lo menos un lípido susceptible de cambio de geometría molecular por medio de cambios de temperatura, presencia de iones divalentes y/o presencia de fármacos. Dicho lípido siendo preferiblemente
5 seleccionado entre fosfatidato, cardiolipina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, esfingomielina, diacilglicerol, monoglucosildiacil-glicéridos o fosfatidiletanolamina. En una modalidad preferida, el lípido se encuentra en abundancia en la membrana celular.

En una modalidad específica, los lípidos utilizados para formar los liposomas se seleccionan conforme a su disponibilidad en la membrana celular y contra los cuales se han
10 detectado anticuerpos antifosfolípidos en humanos; utilizándose preferiblemente un lípido de forma molecular cilíndrica en combinación con un lípido de forma molecular cónica, en una relación molar desde 1:1 a 4:1. En una modalidad adicional, se utiliza una combinación de fosfatidilcolina con fosfatidato de yema de huevo, en una relación molar 2:1.

En otra modalidad adicional, se hace reaccionar con el antígeno de células neoplásicas o de
15 liposomas por lo menos un anticuerpo policlonal o monoclonal anti-partículas lipídicas, para confirmar la presencia o no de los anticuerpos anti-partículas lipídicas en el suero del sujeto.

En otra modalidad preferida, la detección se realiza de manera directa, haciendo reaccionar células del sujeto con por lo menos un anticuerpo policlonal o monoclonal anti-partículas lipídicas, preferiblemente mediante el uso de por lo menos una técnica seleccionada entre
20 inmunofluorescencia, citofluorometría y ELISA.

En una modalidad adicional, además de las células del sujeto, se hace reaccionar con el anticuerpo por lo menos un antígeno que contenga partículas lipídicas, preferiblemente seleccionado entre células neoplásicas y liposomas de por lo menos un lípido susceptible de cambio de geometría molecular por medio de cambios de temperatura, presencia de iones divalentes y/o
25 presencia de fármacos. Dicho lípido siendo preferiblemente seleccionado entre fosfatidato, cardiolipina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, diacilglicerol, esfingomielina, monoglucosildiacil-glicéridos o fosfatidiletanolamina.

En una modalidad específica, los lípidos utilizados para formar los liposomas se seleccionan conforme a su disponibilidad en la membrana celular, y contra los cuales se han
30 detectado anticuerpos antifosfolípidos en humanos; utilizándose preferiblemente un lípido cilíndrico en combinación con un lípido cónico, en una relación molar desde 1:1 a 4:1. En una modalidad adicional, se utiliza una combinación de fosfatidilcolina con fosfatidato de yema de huevo, en una relación molar 2:1.

Para obtener los liposomas que se utilizan en varias modalidades de la presente invención,
35 se utiliza preferiblemente el método de evaporación de la fase reversa, modificado por Baeza y col. en 1994 (*J. Mol. Evol.*, 39:560-568), y posteriormente se les trata con un agente formador de

partículas lipídicas, preferiblemente seleccionado entre cationes divalentes y fármacos, de estos últimos preferiblemente aquellos que producen el lupus inducido por fármacos en humanos, o combinaciones de los mismos; en donde el tratamiento para formar partículas lipídicas se realiza preferiblemente mediante incubación de los liposomas con una cantidad efectiva del agente formador de partículas lipídicas, a una temperatura de 25 a 40°C, dicha cantidad efectiva siendo preferiblemente en una relación molar lípidos:agente formador de partículas lipídicas desde 1:0.01 hasta 1:300.

Por otra parte, los anticuerpos policlonales anti-partículas lipídicas útiles para diversas modalidades de la presente invención, se obtienen por cualquier método de inmunización de ratones conocido, utilizando un antígeno que contenga partículas lipídicas, preferiblemente por medio de un procedimiento de inmunización del tipo descrito por Baeza y col. (*op. cit.*, 1995), el cual comprende de manera general:

A) Una primera etapa de inmunización de ratones por vía intraesplénica, con una dosis efectiva de liposomas obtenidos a partir de lípidos contra los cuales se han detectado anticuerpos antifosfolípidos en humanos, en donde dichos liposomas contienen partículas lipídicas en su superficie.

B) Una segunda etapa de inmunización de ratones por vía intraperitoneal, con los mismos liposomas y con la misma dosis que los utilizados para la primera etapa de inmunización.

Al finalizar estas etapas, los ratones inmunizados presentan anticuerpos policlonales anti-partículas lipídicas, susceptibles de detección por el método de ELISA-liposomal y/o el método de citofluorometría.

En una modalidad específica, la dosis efectiva de liposomas es de 50 a 200 µg, preferiblemente incubados con una solución de 0.1 a 10 mM de CaCl₂, MnCl₂, clorpromacina, procainamida o combinaciones de los mismos, en presencia de una solución reguladora de pH con pH de 7.0 a 7.4.

En una modalidad adicional, la primera etapa de inmunización comprende administrar los liposomas por lo menos 2 veces por vía intraesplénica con intervalos de 1 semana, y la segunda etapa de inmunización comprende introducir los liposomas por vía intraperitoneal por lo menos 4 veces con intervalos de 2 semanas, mediante el método descrito por Nilsson y col. en 1987 (*J. Immunol. Methods* 99:67-75) y modificado por Aguilar en 1994 ("Caracterización física e inmunológica de arreglos moleculares de no-bicapa en liposomas", Tesis de Maestría, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, 1994).

En otra modalidad adicional, los ratones utilizados para la inmunización, se seleccionan de cepas singénicas, preferiblemente utilizándose ratones de la cepa BALB/c hembras de 2 meses de edad.

A partir de los ratones inmunizados, es posible obtener los anticuerpos monoclonales por medio de cualquier método conocido, preferiblemente mediante la obtención de un hibridoma. En una modalidad específica, el hibridoma se obtiene de acuerdo con las siguientes etapas:

- 5 A) A los ratones que fueron inmunizados por vía intraesplénica y por vía intraperitoneal se les aplica una tercera etapa de inmunización por vía intravenosa, con la dosis de liposomas utilizada para la primera y segunda etapa de inmunización.
- 10 B) Una etapa de fusión de células del bazo de los ratones inmunizados con un mieloma de ratón, que no secrete cadenas gamma ni cadenas kappa, dicha fusión realizándose por lo menos 4 días después de la etapa de inmunización por vía intravenosa, para obtener por lo menos un hibridoma productor de un anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas.
- C) Una etapa de selección de hibridomas que presenten inmunorreacción aceptable, mediante la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas generados por los mismos, por medio del método de ELISA-liposomal y/o el método de citofluorometría.

15 En una modalidad específica, la dosis efectiva de los liposomas es de 50 a 200 µg, preferiblemente incubados con una solución de 0.1 a 10 mM de CaCl₂, MnCl₂, cloropromacina, procainamida o combinaciones de los mismos en presencia de una solución reguladora de pH con pH de 7.0 a 7.4.

20 En una modalidad adicional, la primera etapa de inmunización comprende administrar los liposomas por lo menos 2 veces por vía intraesplénica con intervalos de 1 semana, y la segunda etapa de inmunización comprende introducir los liposomas por vía intraperitoneal por lo menos 4 veces con intervalos de 2 semanas, mediante el método descrito por Nilsson y col. (*op. cit.*, 1987) y modificado por Aguilar (*op. cit.*, 1994).

25 En otra modalidad adicional, los ratones utilizados para la inmunización se seleccionan de cepas singénicas, preferiblemente utilizándose ratones de la cepa BALB/c hembras de 2 meses de edad.

30 En una modalidad preferida de la presente invención, las células de bazo se obtienen según lo descrito por Aguilar (*op. cit.*, 1997), mediante la disgregación del bazo del ratón en un medio de cultivo celular adecuado, preferiblemente medio DMEM incompleto, o medio RPMI adicionado de glutamina 200 mM y de glicina 100 mM; seguido de diversas etapas de purificación y de una lisis de los eritrocitos, preferiblemente con cloruro de amonio, el cual solo rompe eritrocitos sin afectar linfocitos, ni leucocitos en general.

35 Asimismo, preferiblemente se utilizan células de la línea celular de mieloma de ratón P3X63Ag8U.1, obtenida por Yeltan (*Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1978, 81:1-7), derivada de la línea celular obtenida por Kohler y Milstein (*Nature*, 1975, 256:495-497) del mieloma MOPC21 de ratones BALB/c hembras.

Por lo que se refiere al método para realizar la fusión, se utiliza preferiblemente el modificado por Aguilar (*op. cit.*, 1997), que consiste en utilizar las células de bazo y de mieloma con una viabilidad mayor al 85%, las cuales se centrifugan y se mezclan en una proporción celular 1:1, para ser posteriormente sometidas a diversas etapas de lavado y ser cultivadas en placas de cultivo celular previamente sembradas con macrófagos.

En cuanto a los métodos de detección de los anticuerpos anti-partículas lipídicas en sueros de pacientes, mediante el uso de antígenos que contienen partículas lipídicas, o bien, de detección de partículas lipídicas en células de pacientes, mediante el uso de anticuerpos anti-partículas lipídicas, a continuación se describirán las técnicas preferidas para tales detecciones.

Cabe señalar que en la descripción de dichas técnicas el término “portador del anticuerpo”, se refiere a cualquier fluido susceptible de contener anticuerpos anti-partículas lipídicas, como puede ser un plasma o un suero humano o de origen animal, una solución o una suspensión; mientras que el término “antígeno” se refiere a aquellas estructuras susceptibles de contener partículas lipídicas tales como liposomas o células.

Adicionalmente, es importante señalar que en una modalidad específica de la presente invención, antes de iniciar cualquier método de detección, se realiza una inactivación de los sueros o de los plasmas mediante temperatura, preferiblemente sometiéndolos a temperaturas entre 50 y 60°C durante 0.25 a 1 h.

Por otra parte, el método de ELISA-liposomal (Aguilar, *op. cit.*, 1994; 1997; Aguilar y col., *op. cit.* 1999) como su nombre lo indica, es aplicable en aquellos casos en que el antígeno es un liposoma, independientemente del origen del portador del anticuerpo, y comprende las siguientes etapas:

A) Una primera etapa de adición e incubación, en la que se agrega una cantidad efectiva de una suspensión del antígeno a cada uno de los pozos de una inmunoplaqueta de ELISA. Esta inmunoplaqueta seleccionada entre aquellas de alta propiedad de unión a antígenos lipídicos y dicha inmunoplaqueta se incuba de 25 a 30°C durante 0.25 a 2 h.

B) Una segunda etapa de adición e incubación, en la que se agrega una cantidad efectiva de una solución de bloqueo a cada uno de los pozos de la inmunoplaqueta de ELISA, de alta propiedad de unión a antígenos, y dicha inmunoplaqueta se incuba de 25 a 30°C durante 0.25 a 2 h.

C) Una etapa de eliminación de la solución de bloqueo, preferiblemente por succión, con la precaución de evitar que la inmunoplaqueta quede totalmente seca, al eliminar la solución de bloqueo, porque pueden dañarse los antígenos liposomales.

D) Una tercera etapa de adición e incubación, en la que se agrega rápidamente, para evitar que la inmunoplaqueta se seque, una cantidad efectiva del portador del anticuerpo a cada uno de los pozos de la inmunoplaqueta de ELISA, en una dilución portador:solución de

bloqueo desde 1:5 hasta 1:1000; dicha inmunoplaque incubándose durante 0.25 a 2 h a una temperatura entre 25 a 30°C.

E) Una primera etapa de lavado de la inmunoplaque con la solución de bloqueo, preferiblemente repitiéndose 4 veces y evitando que la inmunoplaque quede seca al eliminar la solución de bloqueo.

F) Una cuarta etapa de adición e incubación, en la que se agrega a cada uno de los pozos de la inmunoplaque de ELISA, una cantidad efectiva de un segundo anticuerpo seleccionado preferiblemente entre anticuerpos de una especie diferente a la del portador y que sean anti-Fc de IgG, IgA e IgM de humano o del animal en estudio, o bien anticuerpos anti-Fc de IgM o de IgG dependiendo de la naturaleza del anticuerpo monoclonal, cuando éste sea el portador. Este segundo anticuerpo conjugado a una enzima preferiblemente a peroxidasa. El segundo anticuerpo se usa en una dilución final con solución de bloqueo entre 1:000 y 1:3500, dicha inmunoplaque incubándose en la obscuridad durante 0.25 a 2 h a una temperatura entre 25 a 30°C.

G) Una segunda etapa de lavado de la inmunoplaque con la solución de bloqueo, preferiblemente repitiéndose 4 veces y evitando que la inmunoplaque quede seca al eliminar la solución de bloqueo.

H) Una quinta etapa de adición e incubación, en la que se agrega una cantidad efectiva de los sustratos de la peroxidasa, a cada uno de los pozos de la inmunoplaque de ELISA y dicha placa se incuba durante 0.1 a 0.5 h a una temperatura entre 35 y 40°C; deteniéndose la reacción de la peroxidasa por medio de una cantidad efectiva de ácido sulfúrico.

I) Una etapa de análisis de las placas en un equipo de lectura de ELISA, preferiblemente a 492 nm.

En una modalidad específica, la suspensión del antígeno se obtiene suspendiendo al antígeno en una solución reguladora de pH, a pH de 7.0 a 7.4, en una relación desde 0.1 hasta 0.5 moles de antígeno por litro de solución reguladora de pH.

Asimismo, la solución de bloqueo, comprende un regulador de pH, a pH de 7.0 a 7.4, y un 0.4%, peso en volumen, de una solución con alto contenido de proteínas, preferiblemente gelatina, con o sin una cantidad efectiva de un agente formador de partículas lipídicas, preferiblemente con la cantidad efectiva y el agente formador de partículas lipídicas utilizados para formar el antígeno.

En una modalidad preferida, la cantidad efectiva de la suspensión del antígeno en la etapa A es de 50 hasta 100 µl. Asimismo, el segundo anticuerpo puede estar conjugado a la enzima fosfatasa alcalina, en lugar de la peroxidasa, en este caso se usa el sustrato correspondiente de la fosfatasa.

El método de ELISA-liposomal, permite la determinación simultánea de anticuerpos anti-partículas lipídicas en por lo menos 40 sueros por inmunoplate, cada uno por duplicado, por lo que puede aplicarse con facilidad al diagnóstico de enfermedades en donde se presenta este tipo de anticuerpos.

Por otra parte, el método de citofluorometría liposomal (Baeza y col., *op. cit.*, 1995), como su nombre lo indica, es aplicable en aquellos casos en que el antígeno es un liposoma, independientemente del origen del portador del anticuerpo, y comprende las siguientes etapas:

- A) Una primera etapa de adición e incubación, en la que se agrega el portador del anticuerpo a una suspensión del antígeno, dicho portador estando a una dilución desde 1:5 hasta 1:1000, incubándose la mezcla obtenida durante 0.25 a 2 h a una temperatura entre 35 y 40°C.
- B) Una primera etapa de lavado del antígeno unido al portador, con una solución reguladora de pH, a pH de 7.0 a 7.4, con o sin una cantidad efectiva de un agente formador de partículas lipídicas, preferiblemente con la cantidad efectiva del agente formador utilizado para obtener el antígeno.
- C) Una etapa de recuperación del antígeno unido al portador, preferiblemente por centrifugación.
- D) Una segunda etapa de adición e incubación, en la que se agrega al antígeno unido al portador y centrifugado, una cantidad efectiva de un segundo anticuerpo preferiblemente seleccionado entre anticuerpos de una especie diferente a la del portador y que sean anti-Fc de IgG, IgA e IgM de humano o del animal en estudio, o bien anticuerpos anti-Fc de IgM o de IgG dependiendo de la naturaleza del anticuerpo monoclonal, cuando éste sea el portador. Este segundo anticuerpo conjugado a una sustancia o sustrato fluorescente, preferiblemente isotiocianato de fluoresceína (FITC). El segundo anticuerpo se usa a una dilución final entre 1:25 y 1:500, incubándose la mezcla obtenida durante 0.25 a 2 h en la obscuridad a una temperatura entre 35 y 40°C.
- E) Una segunda etapa de lavado del antígeno unido al portador y éste al segundo anticuerpo, con un regulador de pH, a pH de 7.0 a 7.4, con o sin una cantidad efectiva de un agente formador de partículas lipídicas, preferiblemente con la misma cantidad y el mismo agente formador utilizados para obtener el antígeno.
- F) Una etapa de suspensión y análisis, en la que el antígeno unido al portador y éste al segundo anticuerpo, se suspende en una solución transportadora, seleccionada preferiblemente entre FACS Flow (Beckton Dickinson Co.) y Haema Line 2 (Serotono-Baker Diagnostics, INC). Esta suspensión tiene una cantidad de antígeno desde 0.1 hasta 0.5 moles en un litro de la solución, dicha solución siendo

preferiblemente filtrada previamente con un filtro de 0.22 μm de diámetro de poro, analizándose la mezcla obtenida en un citómetro de flujo, preferiblemente con rayo láser de argón de 488 nm.

En una modalidad preferida, la suspensión del antígeno se obtiene suspendiendo el antígeno en una solución reguladora de pH, a pH de 7.0 a 7.4, en una relación de 0.1 a 0.5 moles de antígeno por litro de solución reguladora de pH. Asimismo, el sustrato fluorescente también puede seleccionarse del grupo formado por ficoeritrina, Cy3 y Percp.

El método de citofluorometría liposomal tiene una sensibilidad 10 veces mayor que el método de ELISA-liposomal en la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas. Por lo que se aplica cuando se ha obtenido algún resultado dudoso con el método de ELISA-liposomal. El método de citofluorometría, también permite analizar la presencia de partículas lipídicas en los antígenos liposomales o celulares, así como comparar los diferentes tipos de reacción de los anticuerpos policlonales o monoclonales con las partículas lipídicas de dichos antígenos.

En otra modalidad preferida del método de citofluorometría, la suspensión del antígeno puede ser de células de un sujeto humano o animal, en donde la suspensión del antígeno se obtiene suspendiendo las células, preferiblemente células aisladas como eritrocitos, leucocitos e incluso plaquetas en una solución reguladora de pH, a pH de 7.0 a 7.4. Las etapas de este método de citofluorometría son como las que se describieron en los incisos (A) a (F) para la citofluorometría liposomal.

Por lo que se refiere a los métodos celulares, el método de inmunofluorescencia para células, aplicable cuando el antígeno es una célula, comprende las siguientes etapas:

- A) Una etapa de cultivo, en la que se coloca una cantidad efectiva del antígeno, preferiblemente 1×10^6 células, en un cubre objetos colocado dentro de un pozo de una placa de cultivo celular con 24 pozos y se incuba en atmósfera que contenga una cantidad efectiva de CO_2 , a una temperatura entre 35 y 40°C, hasta alcanzar un 90% de confluencia celular.
- B) Una primera etapa de lavado, que consiste en lavar el antígeno con un medio de cultivo adecuado, preferiblemente repitiéndose 2 veces, y con una solución reguladora de fosfatos con pH de 7.0 a 7.4, en condiciones de esterilidad. Con la precaución de evitar que la superficie del cultivo celular quede seca al eliminar la solución reguladora de fosfatos, lo cual puede dañar los antígenos celulares.
- C) Una primera etapa de adición e incubación, en la que se agrega al antígeno una cantidad efectiva de un portador de anticuerpos, preferiblemente de 50 a 200 μl sin diluir, o bien, con una dilución máxima de 1:1000, incubándose en una atmósfera que contenga una cantidad efectiva de CO_2 , durante 0.25 a 2 h, a una temperatura de 35 a 40°C.

D) Una segunda etapa de lavado, que consiste en lavar el antígeno unido al portador con una solución reguladora de fosfatos con pH de 7.0 a 7.4, por lo menos 3 veces. Con la precaución de evitar que la superficie del cultivo celular quede seca al eliminar la solución reguladora de fosfatos.

5 E) Una segunda etapa de adición e incubación, en la que se agrega al antígeno unido al portador, una cantidad efectiva de un segundo anticuerpo seleccionado preferiblemente entre anticuerpos de una especie diferente a la del portador y que sean anti-Fc de IgG, IgA e IgM de humano o del animal en estudio o bien anticuerpos anti-Fc de IgM o de IgG dependiendo de la naturaleza del anticuerpo monoclonal, cuando éste sea el
10 portador. Este segundo anticuerpo conjugado a una sustancia o sustrato fluorescente, preferiblemente a FITC. El segundo anticuerpo se usa en una dilución final entre 1:25 y 1:500, incubándose el antígeno celular de esta reacción en una atmósfera que contenga una cantidad efectiva de CO₂ durante 0.25 a 2 h a una temperatura de 35 a 40°C.

15 F) Una tercera etapa de lavado, que consiste en lavar el antígeno unido al portador y al segundo anticuerpo con una solución reguladora de fosfatos con pH de 7.0 a 7.4, preferiblemente repitiéndose 3 veces. Con la precaución de evitar que la superficie del cultivo celular quede seca al eliminar la solución reguladora de fosfatos.

G) Una etapa de análisis, en la que el cubreobjetos se monta en un portaobjetos con un protector de fluorescencia, preferiblemente VectaShield, para observarse en un
20 microscopio confocal, o con epifluorescencia y óptica de Nomarski.

En una modalidad específica, la cantidad efectiva de CO₂ es entre 1 y 10% en volumen con respecto al aire, mientras que la cantidad efectiva de solución reguladora de fosfatos es entre 1 y 10 ml. Asimismo, el sustrato fluorescente también puede seleccionarse del grupo formado por ficoeritrina, Cy3 y Percp.

25 En otra modalidad preferida del método de inmunofluorescencia, como antígeno pueden usarse los microcortes de un órgano de un sujeto humano o animal, en lugar de un cultivo celular como se describió anteriormente. A excepción de esta diferencia en el antígeno, las etapas de este método de inmunofluorescencia son como las que se describieron en los incisos (B) a (G), para el método de inmunofluorescencia en el que se usa un cultivo celular como antígeno.

30 Por último, el método de ELISA-celular comprende las siguientes etapas:

A) Una etapa de cultivo, en la que se agrega una cantidad efectiva del antígeno celular a cada uno de los pozos de una placa de cultivo celular de 96 pozos, dicho antígeno cultivándose hasta alcanzar un 100% de confluencia en los pozos.

35 B) Una primera etapa de adición e incubación, en la que se agrega una cantidad efectiva de una solución de bloqueo a cada uno de los pozos de la placa de cultivo celular, dicha placa incubándose entre 35 a 40°C durante 0.5 a 1 h.

- C) Una etapa de eliminación de la solución de bloqueo. Con la precaución de evitar que la superficie del cultivo celular quede seca al eliminar la solución de bloqueo, lo cual puede dañar los antígenos celulares.
- 5 D) Una segunda etapa de adición e incubación, en la que se agrega una cantidad efectiva del portador del anticuerpo, a cada uno de los pozos de la placa de cultivo, en una dilución portador:solución de bloqueo desde 1:5 hasta 1:1000. Dicha placa incubándose durante 0.25 a 2.0 h a una temperatura entre 35 y 40°C en presencia de una cantidad efectiva de CO₂.
- 10 E) Una primera etapa de lavado de cultivos con la solución de bloqueo, preferiblemente repitiéndose 3 veces. Con la precaución de evitar que la superficie del cultivo celular quede seca al eliminar la solución de bloqueo.
- 15 F) Una tercera etapa de adición e incubación, en la que se agrega a cada uno de los pozos de la placa de cultivo celular, una cantidad efectiva de un segundo anticuerpo seleccionado preferiblemente entre anticuerpos de una especie diferente a la del portador y que sean anti-Fc de IgG, IgA e IgM de humano o del animal en estudio o bien anticuerpos anti-Fc de IgG o de IgM dependiendo de la naturaleza del anticuerpo monoclonal cuando éste sea el portador. Este segundo anticuerpo conjugado a una enzima preferiblemente peroxidasa. El segundo anticuerpo se usa en una dilución final con solución de bloqueo entre 1:1000 y 1:3500. Dicha placa de cultivo celular incubándose durante 0.25 a 2 h a una temperatura entre 35 y 40°C en presencia de una cantidad efectiva de CO₂.
- 20 G) Una segunda etapa de lavado de cultivos con la solución de bloqueo, preferiblemente repitiéndose 3 veces. Con la precaución de evitar que la superficie del cultivo celular quede seca al eliminar la solución de bloqueo.
- 25 H) Una cuarta etapa de adición e incubación, en la que se agrega una cantidad efectiva de los sustratos de la peroxidasa, a cada uno de los pozos de la placa de cultivo celular, incubándose dicha placa durante 0.1 a 0.5 h a una temperatura entre 35 y 40°C; deteniéndose la reacción de la peroxidasa por medio de una cantidad efectiva de ácido sulfúrico.
- 30 I) Una etapa de análisis de las placas en un equipo de lectura de ELISA, preferiblemente a 492 nm.

En una modalidad específica, la cantidad efectiva de CO₂ es entre 1 y 10 en volumen, con respecto al aire, mientras que la cantidad efectiva de solución reguladora de fosfatos es entre 1 y 10 ml.

- 35 Asimismo, la solución de bloqueo, comprende un regulador de pH, a pH de 7.0 a 7.4, y por lo menos un 5%, volumen en volumen, de una solución con alto contenido de proteínas,

preferiblemente suero fetal de ternera, con o sin una cantidad efectiva de un agente formador de partículas lipídicas, preferiblemente de un agente formador de partículas lipídicas seleccionado entre soluciones de 0.1 a 10 mM de CaCl_2 , MnCl_2 , cloropromacina, procainamida o combinaciones de los mismos.

5 Por otra parte en otra modalidad específica de este método, el segundo anticuerpo puede estar conjugado a la enzima fosfatasa alcalina, en lugar de la peroxidasa, en este caso se usa el sustrato correspondiente de la fosfatasa.

Otro de los aspectos de la presente invención, es un instrumento de diagnóstico *in vitro* de enfermedades relacionadas con anticuerpos antifosfolípidos útil para realizar el método de la presente invención. Este instrumento de diagnóstico incluye por lo menos, un reactivo indicador de la presencia de partículas lipídicas y/o anticuerpos anti-partículas lipídicas en una muestra de un sujeto que presenta alguna de las características clínicas del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario (Tabla 1); o de las enfermedades asociadas al síndrome de antifosfolípidos secundario (Tabla 1) y que aun no presenta anticuerpos anti-cardiolipina, anti-coagulante lúpico, anti-ADN o anti-nucleares; medios para permitir la reacción de la muestra con el reactivo indicador; y, medios para hacer evidente dicha reacción.

En una modalidad preferida, el reactivo indicador se selecciona entre liposomas con partículas lipídicas en su superficie, células neoplásicas, anticuerpos policlonales anti-partículas lipídicas, y/o anticuerpos monoclonales anti-partículas lipídicas.

20 En otra modalidad preferida, la muestra del sujeto se selecciona entre células y plasma o suero del sujeto enfermo. Asimismo, los medios para permitir la reacción comprenden por lo menos una solución reguladora del ambiente de reacción y por lo menos un dispositivo para alojar al reactivo, la muestra y la solución reguladora.

La solución reguladora se selecciona preferiblemente entre soluciones reguladoras de pH, a pH de 7.0 a 7.4, con o sin un agente formador de partículas lipídicas y soluciones reguladoras de fosfatos, a pH de 7.0 a 7.4, con o sin un agente formador de partículas lipídicas.

Por su parte, el dispositivo para alojar al reactivo, la muestra y la solución reguladora se selecciona preferiblemente entre tubos para centrifugación, cajas para cultivo celular de 24 pozos que tienen un cubreobjetos en el fondo; inmunoplaquetas de ELISA de alta propiedad de unión a antígenos lipídicos; y, placas para cultivo celular de 96 pozos. En la modalidad en que se utilizan inmunoplaquetas de ELISA y/o placas para ELISA celular, el instrumento de diagnóstico incluye además una solución de bloqueo que comprende un regulador de pH, a pH de 7.0 a 7.4, y un 0.4 a 5%, peso en volumen, de una solución con alto contenido de proteínas y con una cantidad efectiva de un agente formador de partículas lipídicas, la proteína preferiblemente siendo seleccionada entre gelatina y suero fetal de ternera.

Por otra parte, los medios para hacer evidente la reacción se seleccionan entre medios fluorescentes y medios enzimáticos, preferiblemente reacciones de anticuerpos conjugados a un fluorocromo, preferiblemente a isotiocianato de fluoresceína o conjugados a una enzima, preferiblemente a peroxidasa.

5 Por lo que se refiere a la muestra del sujeto, ésta se selecciona preferiblemente entre plasma o suero del sujeto y células de órganos del sujeto.

Un aspecto más de la presente invención, consiste en prevenir o tratar enfermedades relacionadas con anticuerpos antifosfolípidos, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco inhibidor, para el bloqueo de los anticuerpos anti-
10 partículas lipídicas de los enfermos, o bien, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco estabilizador, para lograr la estabilización de las membranas celulares de los enfermos. Lo anterior se logra mediante la inhibición o el bloqueo de los anticuerpos anti-partículas lipídicas de los enfermos, con haptenos fosforilados, que son sustancias químicas que forman parte de la región polar de los lípidos de la membrana celular, en
15 forma similar a como se ha demostrado en la inhibición del anticuerpo monoclonal H308 con los haptenos fosforilcolina y glicerolfosforilcolina (Aguilar, *op. cit.* 1997).

Respecto a la estabilización de las membranas celulares, se usan cantidades terapéuticamente efectivas de fármacos del tipo de los antimaláricos, que también se han empleado en el tratamiento de algunas enfermedades del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, como la
20 artritis reumatoide y el lupus eritematoso generalizado Gibson y col., 1987, *Br. J. Rheumatol.* 26:279-285). Entre estos fármacos se pueden mencionar a la cloroquina, la hidroxicloroquina, la amodiaquina, la quinacrina o la primaquina, o bien poliaminas como la putrescina, la espermidina o la espermina; que son policationes que estabilizan las membranas celulares (Schuber, 1989, *Biochem. J.* 260:1-10). Ambos tipos de fármacos impiden la formación de las partículas lipídicas
25 en los modelos membranales liposomales o en las propias membranas celulares, lo que impide posteriormente la unión de los anticuerpos anti-partículas lipídicas, de acuerdo con los estudios realizados por nuestro grupo de investigación.

Cuando se emplea en la presente invención "una cantidad terapéuticamente efectiva" de un fármaco inhibidor, esta es una cantidad del fármaco inhibidor que cuando se administra resulta en
30 el bloqueo de los anticuerpos anti-partículas lipídicas que circulan por el torrente sanguíneo del sujeto bajo consideración. "Una cantidad terapéuticamente efectiva" de un fármaco estabilizador es una cantidad del fármaco estabilizador que cuando se administra resulta en la estabilización de las membranas celulares en un sujeto bajo consideración, de manera que ya no se generan más anticuerpos anti-partículas lipídicas en dicho sujeto, o bien que los anticuerpos anti-partículas
35 lipídicas presentes en el sujeto ya no reaccionan con las membranas celulares porque dichas membranas ya no presentan partículas lipídicas.

Los estudios de inhibición de los anticuerpos anti-partículas lipídicas se hicieron usando liposomas como antígenos y con el método de ELISA-liposomal que comprende las siguientes etapas:

- 5 A) Una primera etapa de adición e incubación, en la que se agrega una cantidad efectiva de una suspensión del antígeno a cada uno de los pozos de una inmunoplaqueta de ELISA. Esta inmunoplaqueta seleccionada entre aquellas de alta propiedad de unión a antígenos lipídicos y dicha inmunoplaqueta se incuba de 25 a 30°C durante 0.25 a 2 h.
- 10 B) Una segunda etapa de adición e incubación, en la que se agrega una cantidad efectiva de una solución de bloqueo a cada uno de los pozos de la inmunoplaqueta de ELISA, de alta propiedad de unión a antígenos, y dicha inmunoplaqueta se incuba de 25 a 30°C durante 0.25 a 2 h.
- 15 C) Una etapa de eliminación de la solución de bloqueo, preferiblemente por succión, con la precaución de evitar que la inmunoplaqueta quede totalmente seca al eliminar la solución de bloqueo, porque pueden dañarse los antígenos liposomales.
- 20 D) Una etapa de inhibición del portador del anticuerpo, en la que se incuba el portador del anticuerpo con una sustancia química, o hapteno, que va a inhibir el sitio activo que reconoce al antígeno en dicho portador del anticuerpo.
- 25 E) Una tercera etapa de adición e incubación, en la que se agrega rápidamente, para evitar que la inmunoplaqueta se seque, una cantidad efectiva del portador del anticuerpo inhibido por el hapteno, a cada uno de los pozos de la inmunoplaqueta de ELISA, en una dilución portador:solución de bloqueo desde 1:5 hasta 1:1000. Dicha inmunoplaqueta incubándose durante 0.25 a 2 h a una temperatura entre 25 a 30°C.
- 30 F) Una primera etapa de lavado de la inmunoplaqueta con la solución de bloqueo, preferiblemente repitiéndose 4 veces. Con la precaución de evitar que la inmunoplaqueta quede seca al eliminar la solución de bloqueo.
- G) Una cuarta etapa de adición e incubación, en la que se agrega a cada uno de los pozos de la inmunoplaqueta de ELISA, una cantidad efectiva de un segundo anticuerpo seleccionado preferiblemente entre anticuerpos de una especie diferente a la del portador y que sean anti-Fc de IgG, IgA e IgM de humano o del animal en estudio, o bien anticuerpos anti-Fc de IgM o de IgG dependiendo de la naturaleza del anticuerpo monoclonal, cuando éste sea el portador. Este segundo anticuerpo conjugado a una enzima preferiblemente a peroxidasa. El segundo anticuerpo se usa en una dilución final con solución de bloqueo entre 1:1000 y 1:3500. Dicha inmunoplaqueta incubándose en la obscuridad durante 0.25 a 2 h a una temperatura entre 25 a 30°C.

H) Una segunda etapa de lavado de la inmunoplaaca con la solución de bloqueo, preferiblemente repitiéndose 4 veces. Con la precaución de evitar que la inmunoplaaca quede seca al eliminar la solución de bloqueo.

I) Una quinta etapa de adición e incubación, en la que se agrega una cantidad efectiva de los sustratos de la peroxidasa, a cada uno de los pozos de la inmunoplaaca de ELISA y dicha placa se incuba durante 0.1 a 0.5 h a una temperatura entre 35 y 40°C; deteniéndose la reacción de la peroxidasa por medio de una cantidad efectiva de ácido sulfúrico.

J) Una etapa de análisis de las placas en un equipo de lectura de ELISA, preferiblemente a 492 nm.

En una modalidad específica, la suspensión del antígeno se obtiene suspendiendo al antígeno en una solución reguladora de pH, a pH entre 7.0 y 7.4, en una relación desde 0.1 hasta 0.5 moles de antígeno por litro de solución reguladora de pH.

Asimismo, la solución de bloqueo, comprende un regulador de pH, a pH entre 7.0 y 7.4, y un 0.4%, peso en volumen, de una solución con alto contenido de proteínas, preferiblemente gelatina, con o sin una cantidad efectiva de un agente formador de partículas lipídicas, preferiblemente con la cantidad efectiva y el agente formador de partículas lipídicas utilizados para formar el antígeno.

En una modalidad preferida, la cantidad efectiva de la suspensión del antígeno en la etapa A es de 50 hasta 100 µl. Asimismo, el segundo anticuerpo puede estar conjugado a la enzima fosfatasa alcalina, en lugar de la peroxidasa, en este caso se usa el sustrato correspondiente de esta fosfatasa.

En una modalidad específica, la solución del hapteno se obtiene disolviendo al hapteno en una solución reguladora de pH, a pH entre 7.0 y 7.4, en una relación desde 0.1 hasta 10 mmoles de hapteno por litro de solución reguladora de pH.

En lo que se refiere a la estabilización de las membranas con fármacos que impiden la formación de las partículas lipídicas en los modelos membranales liposomales o en las membranas celulares, lo que a su vez impide la unión posterior de los anticuerpos anti-partículas lipídicas, los estudios se hicieron con antígenos liposomales o celulares empleando el método de citofluorometría. En una modalidad preferida este método comprende las siguientes etapas:

A) Una primera etapa de incubación de la suspensión del antígeno con un fármaco que estabilice su bicapa lipídica, dicho fármaco estando a una concentración desde 0.1 hasta 100 µmolar, incubándose la mezcla obtenida durante 0.25 a 2 h a una temperatura entre 35 y 40°C.

B) Una primera etapa de adición e incubación, en la que se agrega el portador del anticuerpo a la suspensión del antígeno estabilizada con el fármaco, dicho portador

estando a una dilución desde 1:5 hasta 1:1000, incubándose la mezcla obtenida durante 0.25 a 2 h a una temperatura entre 35 y 40°C.

- 5 C) Una primera etapa de lavado del antígeno estabilizado con el fármaco y unido al portador, con una solución reguladora de pH, a pH 7.0 a 7.4, con o sin una cantidad efectiva de un agente formador de partículas lipídicas, preferiblemente con la cantidad efectiva del agente formador utilizado para obtener el antígeno.
- D) Una etapa de recuperación del antígeno estabilizado con el fármaco y unido al portador, preferiblemente por centrifugación.
- 10 E) Una segunda etapa de adición e incubación, en la que se agrega al antígeno estabilizado con el fármaco y unido al portador y centrifugado, una cantidad efectiva de un segundo anticuerpo preferiblemente seleccionado entre anticuerpos de una especie diferente a la del portador y que sean anti-Fc de IgG, IgA e IgM de humano o del animal en estudio, o bien anticuerpos anti-Fc de IgM o de IgG dependiendo de la naturaleza del anticuerpo monoclonal, cuando éste sea el portador. Este segundo anticuerpo
- 15 conjugado a una sustancia o substrato fluorescente, preferiblemente a FITC. El segundo anticuerpo se usa para tener una dilución final entre 1:25 y 1:500, incubándose la mezcla obtenida durante 0.25 a 2 h en la obscuridad a una temperatura entre 35 y 40°C.
- 20 F) Una segunda etapa de lavado del antígeno estabilizado por el fármaco y unido al portador y al segundo anticuerpo, con un regulador de pH, a pH 7.0 a 7.4, con o sin una cantidad efectiva de un agente formador de partículas lipídicas, preferiblemente con la misma cantidad y el mismo agente formador utilizados para obtener el antígeno.
- 25 G) Una etapa de suspensión y análisis, en la que el antígeno estabilizado por el fármaco y unido al portador y al segundo anticuerpo, se suspende en una solución transportadora, seleccionada preferiblemente entre FACS Flow (Beckton Dickinson Co.) y Haema Line 2 (Serotono-Baker Diagnostics, INC). Esta suspensión tiene una cantidad de antígeno desde 0.1 hasta 0.5 moles en un litro de la solución, dicha solución siendo preferiblemente filtrada previamente con un filtro de 0.22 μ m de diámetro de poro, analizándose la mezcla obtenida en un citómetro de flujo, preferiblemente con rayo
- 30 láser de argón de 488 nm.

En una modalidad preferida, la suspensión del antígeno se obtiene suspendiendo el antígeno en una solución reguladora de pH, a pH de 7.0 a 7.4, en una relación de 0.1 a 0.5 moles de antígeno por litro de solución reguladora de pH. Este antígeno se incuba con un fármaco que estabilice su bicapa lipídica, dicho fármaco estando a una concentración desde 0.1 hasta 100 μ molar, incubándose la mezcla obtenida durante 0.25 a 2 h a una temperatura entre 35 y 40°C.

35

En una modalidad específica el antígeno puede ser una suspensión de liposomas o de células de humanos. Asimismo, el sustrato fluorescente también puede seleccionarse del grupo formado por ficoeritrina, Cy3 y Percp.

Los diversos aspectos de la presente invención, serán más claramente ilustrados por medio de los siguientes ejemplos, los cuales se presentan únicamente con propósitos ilustrativos y no deberán interpretarse en forma limitativa

EJEMPLOS.

Los antígenos liposomales que se emplearon en todos los ejemplos que se describen a continuación fueron caracterizados por sus espectros de resonancia magnética nuclear que muestran los lípidos asociados en bicapa o en partículas lipídicas como se ha descrito por Baeza y col. (*op. cit.*, 1995), por Aguilar (*op. cit.*, 1997) y por Aguilar y col. (*op. cit.*, 1999).

Ejemplo 1. Detección indirecta de partículas lipídicas mediante la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en sueros de enfermos con el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, por el método de ELISA-liposomal.

Se colocaron 100 µl de una suspensión de liposomas formados de fosfatidilcolina:fosfatidato (relación molar 2:1) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), pH 7, con un contenido de fosfatidato de 0.1 µmol, y que se incubaron con CaCl₂ 5 mM, en cada pozo de una inmunoplaaca de ELISA de poliestireno, de 96 pozos de fondo plano y de alta propiedad de unión a antígenos lipídicos (Costar Co. Cambrige, USA), y la inmunoplaaca se incubó 1 h a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 200 µl de una solución de bloqueo con gelatina al 0.4% en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), pH 7, con CaCl₂ 5 mM y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente las soluciones de bloqueo se retiraron por succión, y se agregaron rápidamente a los pozos, para evitar que dichos pozos se sequen, 100 µl de sueros de sujetos humanos a una dilución final de 1:50 y a 4 pozos se agregaron 100 µl del sobrenadante de un hibridoma que genera un anticuerpo monoclonal, del isotipo IgM, anti-partículas lipídicas a una dilución final 1:100, y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Los sueros se trataron previamente a 56°C durante 30 min para inactivar el complemento. Después de la incubación las inmunoplaacas se lavaron 4 veces con 500 µl de la solución de bloqueo. Posteriormente se agregaron a cada pozo 100 µl del segundo anticuerpo que son anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG, IgA e IgM de humano ó anti-Fc de IgM de ratón conjugados a peroxidasa, en dilución 1:2000 y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Al término de esta incubación las placas se lavaron como se indicó anteriormente y se agregaron a cada pozo 100 µl de los sustratos de la peroxidasa, o-fenilendiamina (10 mg en 25 ml de regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), a pH 7 más 20 µl de

H₂O₂ al 30%, y se incubó a 37°C durante 20 min. La reacción se detuvo con 50 µl de ácido sulfúrico 2.5 M y las absorbencias correspondientes se leyeron a 492 nm en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS). Como controles negativos se agregaron los sueros de los sujetos y el segundo anticuerpo a dos pozos de la inmunoplaaca que carecían de antígenos liposomales, así como se agregó el segundo anticuerpo a dos pozos de la inmunoplaaca en ausencia del suero de los sujetos.

Los resultados obtenidos por el ELISA-liposomal se expresan en unidades arbitrarias (UA) las cuales se determinan con la siguiente ecuación:

$$UA = \frac{AsP - AsB}{AsS - AsB}$$

En donde:

AsP= Absorbencia a 492 nm de los sueros de los pacientes.

AsB= Absorbencia a 492 nm del control que contiene todos los reactivos a excepción del suero humano.

AsS= Absorbencia a 492 nm de la mezcla de los sueros de los donadores del banco de sangre.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos anti-partículas lipídicas, los sueros humanos que dieron reacción positiva se volvieron a analizar pero se emplearon como segundo anticuerpo los anticuerpos de cabra anti-IgG ó anti-IgM de humano conjugados a peroxidasa, para determinar si los anticuerpos anti-partículas lipídicas corresponden al isotipo IgG o IgM, respectivamente.

Sueros humanos analizados.

Los sueros estudiados fueron del Banco del Laboratorio de Inmunología del Hospital de Especialidades del Centro Médico La Raza, de México, D. F., México, y provenían de treinta pacientes positivos para anticuerpos anti-cardiolipina del isotipo IgM o IgG. Para este estudio se usó como antígeno el lípido cardiolipina unido a placas de ELISA (Loizou y col., 1985, *Clin. Exp. Immunol.* 62:738-745). Los resultados también se expresan en unidades arbitrarias (UA) y se consideran positivos cuando se tienen valores ≥ 1.9 UA para el isotipo IgG y ≥ 2.4 UA para el isotipo IgM (Loizou y col., *op. cit.*, 1985). Todos los sueros de pacientes fueron positivos para el isotipo IgG y algunos de ellos fueron positivos para el isotipo IgM (Tabla 2). Los sueros de los donadores del banco de sangre, es decir de sujetos sanos, que se emplearon como controles negativos de las reacciones inmunes analizadas, no presentaron anticuerpos del isotipo IgM o IgG contra cardiolipina (Tabla 2). Estos sueros provenían del Banco de Sangre del Centro Médico La Raza, de México, D. F., México.

De los pacientes once satisfacían cuatro o más de los criterios de la "American Rheumatism Association" para lupus eritematoso generalizado (LEG) (Tan y col., 1982, *Arthritis*

Rheum. 25:1271-1277), doce cumplieron criterios para el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario (SAAFP) (Asherson y col., *op. cit.*, 1996, Piette y col., 1993, *J. Rheumatol.* 20:1802-1804), y siete para el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF) secundario a LEG (Asherson y col., *op. cit.*, 1996) (Tabla 1).

- 5 Los sueros de los pacientes y de los donadores del banco de sangre nos fueron proporcionados por el Dr. Carlos Lavalle Director del Hospital de Infectología del Centro Médico La Raza, de México, D. F., México.

10

Tabla 1

Criterios para la clasificación del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario, del lupus eritematoso generalizado, y del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario a lupus eritematoso generalizado de la "American Rheumatism Association".

15

Lupus eritematoso generalizado	Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario	Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario a lupus eritematoso generalizado
Serositis : Pleuritis Pericarditis	Trombosis venosa y arterial : Renopatías Embolia pulmonar Isquemia cerebral Necrosis en piel Infarto al miocardio con uremia	Eritema maxilar Eritema discoide Ulceración de la faringe y bocal Artritis
Nefropatías	Nefropatías	Glomerulonefritis con proteinuria de 0.5g/día
Desórdenes neurológicos : Ataques Psicosis	Desórdenes neurológicos : Ataques Psicosis	Pleuritis, con abscesos pulmonar Pericarditis, infarto al miocardio con uremia.
Desórdenes hematológicos : Trombocitopenias Anemia hemolítica	Desórdenes hematológicos : Trombocitopenias Anemia hemolítica	Anticuerpos anti-DNA ds Anticuerpos antifosfolípidos Anticuerpos anti- β_2 glicoproteína I
Desórdenes inmunológicos : VDRL falso positivo Anticuerpos anti-DNAs Anticuerpos antinucleares	Anticuerpos antifosfolípidos : Anti-cardiolipina Anticoagulante lúpico Anti-fosfatidiletanolamina Anti-fosfatidilserina	Trombosis venosa y arterial : Renopatías Embolia pulmonar Isquemia cerebral Necrosis en piel Infarto al miocardio con uremia
	Anticuerpos anti- β_2 glicoproteína I	Linfopenia 1000 linfocitos/ μ l
	Pérdida fetal recurrente	Pérdida fetal recurrente

20

Tabla 2
Determinación de anticuerpos anti-cardiolipina, y de anticuerpos contra lípidos asociados en partículas lipídicas en sueros humanos

Sueros de Donadores Del banco de sangre	Anticuerpos Anti-cardiolipina (ELISA)		Sueros de Enfermos	Anticuerpos antipartículas lipídicas (antígeno liposomal de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1) + CaCl ₂ 5 mM) (Citofluorometría)		Anticuerpos Anti-cardiolipina (ELISA)		Anticuerpos anti-partículas lipídicas (antígeno liposomal de fosfatidilcolina: fosfatidato (2:1) + CaCl ₂ 5 mM) (Citofluorometría)	
	IgM (+) ≥ 2.4 UA	IgG (+) ≥ 1.9 UA		Resultados positivos a: D≥0.5, p<0.001	Diagnóstico	IgM (+) ≥ 2.4 UA	IgG (+) ≥ 1.9 UA	Polivalente	Resultados positivos a: D≥0.5, p<0.001 IgG
1N	-	-	AC11	SAAFP	-	-	7.5	D=0.76	-
2N	-	-	AC12	SAAFP	-	-	56.3	D=0.77	-
3N	-	-	AC13	LEG	5.24	-	17.2	D=0.65	D=0.70
4N	-	-	AC14	LEG	-	-	10.6	D=0.74	D=0.62
5N	-	-	AC15	SAAFP	-	-	6.7	D=0.74	D=0.84
6N	-	-	AC16	LEG	-	-	2.52	D=0.75	D=0.59
7N	-	-	AC17	LEG	-	-	4.3	D=0.75	D=0.59
8N	-	-	AC18	LEG + SAAF	-	-	67.4	D=0.73	D=0.63
9N	-	-	AC19	LEG	-	-	13.6	D=0.73	D=0.73
10N	-	-	AC20	LEG	-	-	9.3	D=0.75	D=0.73
11N	-	-	AC21	SAAFP	-	-	3.36	D=0.75	D=0.62
12N	-	-	AC22	LEG + SAAF	2.8	-	15.4	D=0.56	D=0.61
13N	-	-	AC23	LEG + SAAF	-	-	19.2	D=0.59	D=0.61
14N	-	-	AC24	SAAFP	-	-	18.0	D=0.61	D=0.61
15N	-	-	AC25	SAAFP	3.95	-	16.3	D=0.53	D=0.62
16N	-	-	AC26	LEG	3.06	-	9.2	D=0.53	D=0.62
17N	-	-	AC27	SAAFP	-	-	8.6	D=0.51	D=0.54
18N	-	-	AC28	SAAFP	-	-	11.5	D=0.51	D=0.54
19N	-	-	AC29	LEG	-	-	11.08	D=0.43	D=0.57
20N	-	-	AC30	SAAFP	-	-	14.7	no det.	D=0.57
21N	-	-	AC31	LEG + SAAF	-	-	19.4	D=0.66	D=0.50
22N	-	-	AC32	LEG + SAAF	3.0	-	39.6	D=0.56	D=0.57
23N	-	-	AC33	SAAFP	-	-	23.7	D=0.56	D=0.54
24N	-	-	AC34	LEG + SAAF	-	-	34.4	D=0.56	D=0.74
25N	-	-	AC35	SAAFP	4.0	-	18.0	D=0.66	D=0.75
26N	-	-	AC36	LEG	44.0	-	158.0	D=0.64	D=0.64
27N	-	-	AC37	LEG	-	-	11.0	D=0.64	D=0.75
28N	-	-	AC38	SAAFP	3.0	-	2.0	D=0.64	D=0.75
29N	-	-	AC39	LEG + SAAF	-	-	52.0	D=0.64	D=0.75
30N	-	-	AC40	LEG	4.0	-	18.0	D=0.66	D=0.75

SAAFP: Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario. LEG: - Lupus eritematoso generalizado.

SAAF + LEG: - Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario a lupus eritematoso generalizado.

Resultados del análisis de los sueros humanos por ELISA-liposomal.

El análisis de los sueros humanos, tanto de donadores del banco de sangre como de enfermos con el síndrome de antifosfolípidos, con antígenos liposomales de fosfatidilcolina:fosfatidato (relación molar 2:1) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), pH 7, que contienen 0.1 μ mol de fosfatidato, y que fueron incubados en presencia de CaCl_2 5 mM, por lo que llevan partículas lipídicas, se presenta en la Figura 1. La diferencia en la inmunorreacción con las partículas lipídicas entre los sueros de los pacientes y los sueros control, que son una mezcla de los 30 sueros de donadores del banco de sangre, es muy clara ya que la reacción con los sustratos de la peroxidasa fue negativa con los sueros control. En general los sueros control dieron valores menores de una unidad arbitraria, por lo que se estableció que valores de unidades arbitrarias mayores de 1.5 serían reacciones positivas. En la gráfica 1 la línea indica el límite por arriba del cual las reacciones de los sueros con los antígenos lipídicos son positivas. La reacción de la mayoría de los sueros de los pacientes fue claramente positiva, con valores de unidades arbitrarias mayores de 6.

En la Figura 1 se presentan los valores de 7 sueros (AC12, AC14, AC15, AC16, AC31, AC32 y AC34) que son representativos de los 30 sueros de pacientes analizados. Los sueros AC12 y AC15 corresponden a pacientes con el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario (SAAFP); los sueros AC14 y AC16 a pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG) y los AC31, AC32 y AC34 a pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario a lupus eritematoso generalizado (SAAF secundario a LEG). En esta figura se presenta como control positivo la reacción de los anticuerpos monoclonales H308 con los antígenos liposomales de fosfatidilcolina: fosfatidato (relación molar 2:1) incubados en presencia de CaCl_2 5 mM que llevan partículas lipídicas. Se emplearon anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG humana unidos a peroxidasa como segundo anticuerpo para los sueros humanos y anti-Fc de IgM de ratón para el anticuerpo monoclonal, ambos a una dilución final de 1:2000.

Una particularidad importante de este método de ELISA-liposomal consiste en que permite la determinación simultánea de anticuerpos anti-partículas lipídicas en por lo menos 40 sueros por inmunoplaaca, cada uno por duplicado; razón por la que puede aplicarse con facilidad al diagnóstico de enfermedades en donde se presenta este tipo de anticuerpos.

Ejemplo 1A Comparación cuando se usan antígenos sin partículas lipídicas y sueros de enfermos con el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos en el método de ELISA-liposomal.

Se repitió el ejemplo 1 utilizando como antígenos liposomas "rígidos" formados de dipalmitoilfosfatidilcolina:fosfatidilcolina de yema de huevo:dipalmitoilfosfatidato (relación molar 1.2:0.8:1.0) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), pH 7, que incubados con BaCl_2 5 mM

conservan la superficie lisa de bicapa. En este caso, la reacción de los sustratos de la peroxidasa unida al segundo anticuerpo fue negativa. Esto es debido a que los liposomas no tenían partículas lipídicas, por lo tanto los anticuerpos anti-partículas lipídicas no reaccionaron con ellos y consecuentemente el segundo anticuerpo tampoco se unió a los liposomas, lo cual explica la reacción negativa de los sustratos de la peroxidasa. Estos resultados descartan que los anticuerpos anti-partículas lipídicas reconozcan complejos lípido-catión divalente y/o la reducción en la carga de la superficie liposomal debido a la unión del catión divalente, sin que ocurra el cambio de la asociación de lípidos en bicapa a la asociación de partículas lipídicas (Aguilar y col., *op. cit.*, 1999).

10 **Ejemplo 1B.** Comparación cuando se usan anticuerpos diferentes a los anticuerpos anti-partículas lipídicas y antígenos liposomales que llevan partículas lipídicas en el método de ELISA-liposomal.

Se repitió el Ejemplo 1 con algunas modificaciones, en este experimento se emplearon los liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato de yema de huevo (relación molar 2:1) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), pH 7, incubados con CaCl_2 5 mM más el segundo anticuerpo que son los anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG, IgA e IgM de humano conjugados a peroxidasa, o bien los liposomas se incubaron con CaCl_2 5 mM más el sobrenadante de un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales inespecíficos, como el de IgM de ratón que son anticuerpos contra una proteína membranal de *Trichinella spiralis*, más anticuerpos de cabra anti-Fc de IgM de ratón conjugados a peroxidasa. En ambos casos, la reacción con los sustratos de la peroxidasa fue negativa, debido a que en ausencia del anticuerpo humano anti-partículas lipídicas, o del anticuerpo monoclonal de ratón anti-partículas lipídicas, los anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG, IgA e IgM de humano o los anti-Fc de IgM de ratón conjugados a peroxidasa, no se unen directamente a las partículas lipídicas inducidas por calcio en los liposomas.

25 **Ejemplo 1C.** Comparación cuando se usan anticuerpos anti-partículas lipídicas y el segundo anticuerpo en ausencia de los antígenos liposomales que llevan partículas lipídicas en el método de ELISA-liposomal.

Se repitió el Ejemplo 1 pero en ausencia de los antígenos liposomales, por lo cual la reacción de los sustratos de la peroxidasa unida al segundo anticuerpo fue negativa. Esto es debido a que los anticuerpos anti-partículas lipídicas no se unen directamente a la inmunoplaque, lo cual pudiera dar un resultado positivo falso, porque la inmunoplaque se encuentra bloqueada con la gelatina que se usa en esta metodología. Consecuentemente, el segundo anticuerpo tampoco se unió a los liposomas, lo cual explica la reacción negativa de los sustratos de la peroxidasa.

35 De los ejemplos anteriores se puede concluir que, en una modalidad preferida de la presente invención, un kit de diagnóstico particularmente útil para la detección por el protocolo de

ELISA-liposomal de anticuerpos anti-partículas lipídicas en cuando menos una muestra de suero de sujetos con enfermedades relacionadas con anticuerpos antifosfolípidos comprende: un reactivo indicador que incluye, primero, cuando menos liposomas con partículas lipídicas y, segundo, cuando menos un anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas; cuando menos una solución de bloqueo para evitar posibles resultados falsos positivos; cuando menos una solución reguladora de pH, como medio para permitir la reacción de la muestra procedente del enfermo con dicho reactivo indicador; medios enzimáticos, que incluyen preferiblemente la enzima peroxidasa, para hacer evidente dicha reacción; y cuando menos una muestra de suero valorado procedente de un individuo sano, como control negativo de la reacción con los antígenos liposomales que portan partículas lipídicas.

En esta modalidad preferida del kit de diagnóstico, la muestra de los sueros procedentes de los sujetos enfermos se hace reaccionar con el reactivo indicador de liposomas con partículas lipídicas. Asimismo, el reactivo indicador de liposomas con partículas lipídicas se hace reaccionar con el anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas, como un control positivo de que el sistema para detectar la reacción entre los anticuerpos anti-partículas lipídicas del suero de sujetos con enfermedades relacionadas con anticuerpos antifosfolípidos y el antígeno que contiene partículas lipídicas, funciona correctamente.

En una modalidad alternativa, el kit de diagnóstico incluye como parte de él mismo una o más inmunoplaqueta(s) como recipiente(s) para el desarrollo de la reacción. De igual manera, en otra modalidad alternativa la muestra de suero de un individuo sano puede estar no incluida en el kit mismo, obteniéndose, en este caso, de una fuente externa dicha muestra de suero, que sea proveniente de un individuo sano que no presente una enfermedad relacionada con anticuerpos antifosfolípidos.

Ejemplo 2. Detección de la autofluorescencia de los antígenos liposomales por citofluorometría.

Se emplearon 100 µl de liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato de yema de huevo (relación molar 2:1) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), pH 7, que contienen 0.1 µmol de fosfatidato y se analizaron en el citómetro FACScalibur equipado con rayo láser de argón de 488 nm (Beckton Dickinson). Las lecturas de autofluorescencia se obtuvieron de 10,000 liposomas, en escala logarítmica y se hicieron en el canal FL-1 a 748 V (Baeza y col., *op. cit.* 1995). Los datos obtenidos se analizaron con el programa Cellquest (Beckton Dickinson).

Los histogramas de autofluorescencia que se obtuvieron de los liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (relación molar 2:1) de yema de huevo, presentaron valores entre 1 y 10 unidades de fluorescencia (a, Fig. 2A). La detección de esta autofluorescencia permitió la aplicación de la citofluorometría al análisis de reacciones inmunológicas en donde se usan antígenos liposomales. La autofluorescencia liposomal (a, Fig. 2A) no se modificó al incubar los

liposomas con CaCl_2 5 mM (c, Fig. 2B), lo cual indica que la presencia de las partículas lipídicas en los liposomas no modificó su autofluorescencia. Esta fluorescencia tampoco se modificó al agregar el segundo anticuerpo anti-Fc de IgG, IgA e IgM de humano o anti-Fc de IgM de ratón conjugado a FITC, lo cual indica que estos anticuerpos no se unen directamente a los antígenos liposomales, y por lo tanto no pueden producir una reacción falsa positiva. Los resultados con el segundo anticuerpo anti-Fc de IgG IgA e IgM humanos conjugado a FITC a una dilución final de 1:200 se muestran en b, Fig. 2A y d, Fig. 2B, con los antígenos liposomales tanto en ausencia de CaCl_2 (b, Fig. 2A) como en presencia de este catión (d, Fig. 2B).

Resultados similares se obtuvieron con los liposomas obtenidos de fosfatidilcolina, de fosfatidilcolina:cardiolipina (relación molar 2:1), de fosfatidilcolina:fosfatidilserina (relación molar 4:1) o de dipalmitoilfosfatidilcolina:fosfatidilcolina de yema de huevo:dipalmitoil-fosfatidato (relación molar 1.2:0.8:1), respectivamente. Por lo tanto la citofluorometría puede aplicarse en general al análisis de reacciones inmunológicas en donde se usen antígenos liposomales con diferentes formulaciones lipídicas.

Ejemplo 2A. Detección de partículas lipídicas con el anticuerpo monoclonal H308 por el método de citometría liposomal.

Se colocaron 100 μl de liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato de yema de huevo (relación molar 2:1) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), pH 7, que contienen 0.1 μmol de fosfatidato y que se incubaron con CaCl_2 5 mM, en tubos para ultracentrífuga (Beckman ultra-clear No. 344060) de 14 x 95 mm. A cada una de estas alícuotas se les adicionó el sobrenadante de un hibridoma, el H308, que genera un anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas a una dilución final de 1:100 y se incubaron durante 1 h a 37°C. Después de la incubación los liposomas se lavaron con 12 ml del regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), a pH 7, conteniendo CaCl_2 5 mM. Los liposomas se recuperaron por centrifugación en la ultracentrífuga Beckman L8-M, a 202,000 x g durante 50 min a 18°C. A continuación se agregó a cada tubo como segundo anticuerpo los anticuerpos de cabra anti-Fc de IgM de ratón conjugados a FITC, para tener una dilución final de 1:200 y se incubó 1 h en la oscuridad. Al final de la incubación los liposomas se lavaron como se indicó previamente. Por último las preparaciones de liposomas se resuspendieron en 500 μl de la solución de FACS Flow (Beckton Dickinson Co.) filtrada con un filtro Millipore de 0.22 μm de diámetro de poro. Esta suspensión se analizó por citofluorometría en el citómetro FACScalibur, equipado con rayo láser de argón de 488 nm (Beckton Dickinson).

Las lecturas de fluorescencia se hicieron en el canal FL-1. El tamaño relativo y/o la agregación de los liposomas se analizó por la difracción del rayo láser en el canal FSC (forward scatter light) y la granularidad o complejidad de las bicapas liposomales se analizó por la refracción y la reflexión del láser en el canal SSC (side scatter light). El análisis de 10,000 liposomas se hizo

en escala logarítmica con los siguientes detectores: FSC en E00, con un tamaño mínimo de detección de liposomas a 52 V; SSC de 401 V y FL-1 de 748 V (Baeza y col., *op. cit.*, 1995). Los datos obtenidos se analizaron con el programa Cellquest (Beckton Dickinson).

También se emplearon como antígenos liposomas “rígidos” de dipalmitoilfosfatidilcolina:fosfatidilcolina de yema de huevo:dipalmitoilfosfatidato (relación molar 1.2:0.8:1) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), pH 7, solos o incubados con BaCl₂.

El anticuerpo monoclonal H308 no presentó reactividad con los lípidos asociados en bicapa, ya que la fluorescencia detectada en los liposomas incubados con este anticuerpo (a, Fig. 3A), fue igual a la autofluorescencia de los liposomas control en Tris-NaCl, tanto solos como tratados con calcio, que no fueron incubados con el anticuerpo (g, h, Fig. 3D). En cambio, el aumento de 60 veces en la fluorescencia de los liposomas tratados con calcio (b, Fig. 3A), con un valor en la diferencia entre las poblaciones de liposomas en escala logarítmica ($D = 0.9$ a $p < 0.001$, con respecto a la fluorescencia de los liposomas con lípidos en bicapa (a, Figura 3A), mostró la reacción de estos anticuerpos con las partículas lipídicas inducidas por calcio. Valores de $D \geq 0.5$ a $p < 0.001$ indican una diferencia entre las poblaciones estudiadas que es altamente significativa desde el punto de vista estadístico (Lampariello, 2000, *Cytometry* 39:179-188), en este caso es una diferencia en la fluorescencia de las dos poblaciones de liposomas analizadas.

Por otra parte, los valores de SSC mostraron que el perfil de la distribución de las partículas lipídicas en los liposomas después de la inmunorreacción (d, Fig. 3B) fue diferente al de estas estructuras lipídicas en liposomas que no se incubaron con el anticuerpo monoclonal H308 (j, Fig. 3E), lo cual muestra las propiedades dinámicas de estas estructuras lipídicas. Asimismo, la agregación liposomal, se descartó, porque los valores de FSC, que muestran el tamaño y/o la agregación liposomal, fueron iguales después de la inmunorreacción (f, Fig. 3C) a aquellos de los liposomas con partículas lipídicas que no fueron incubados con el anticuerpo monoclonal H308 (l, Fig. 3F).

La reacción del anticuerpo monoclonal con las partículas lipídicas de los antígenos liposomales, se toma como una referencia positiva de la reacción de anticuerpos con este tipo de estructuras lipídicas. Por lo que es necesario incluir esta determinación como un control positivo en el análisis de la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en sueros de sujetos humanos o animales por citofluorometría liposomal.

Por otra parte, un anticuerpo monoclonal de isotipo IgM, inespecífico para el sistema liposomal analizado, como el dirigido contra una proteína membranal de *Trichinella spiralis*, no dio las reacciones indicadas para el anticuerpo monoclonal H308 con las partículas lipídicas. Ya que las gráficas de citofluorometría obtenidas fueron similares a las de los liposomas control que fueron tratados con calcio en ausencia del anticuerpo monoclonal H308 (h, Fig. 3D; j, Fig. 3E; y l, Fig. 3F).

Al utilizar como antígenos liposomas “rígidos” formados de dipalmitoil-
fosfatidilcolina:fosfatidilcolina de yema de huevo:dipalmitoilfosfatidato que incubados con BaCl_2 5
mM conservan la superficie lisa de bicapa, no hubo reacción con el anticuerpo H308, debido a que
las gráficas de citofluorometría obtenidas (n, Fig. 3G; p, Fig. 3H; y r, Fig. 3I) fueron similares a las
5 de los liposomas que no fueron tratados con BaCl_2 (m, Fig. 3G; o, Fig. 3H; y q, Fig. 3I).

Ejemplo 2B. Detección indirecta de partículas lipídicas mediante la detección de anticuerpos anti-
partículas lipídicas en sueros de enfermos con el síndrome de anticuerpos
antifosfolípidos, por el método de citofluorometría liposomal.

Esta detección es similar a la descrita en el Ejemplo 2A sin embargo se usan sueros de
10 sujetos como el portador del anticuerpo en lugar del anticuerpo monoclonal. Para esta detección se
colocaron 100 μl de liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato de yema de huevo (relación molar
2:1)) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), pH 7, que contienen 0.1 μmol de fosfatidato y
que se incubaron con CaCl_2 5 mM, en tubos para ultracentrífuga (Beckman ultra-clear No. 344060)
15 de 14 x 95 mm. A cada una de estas alícuotas se les adicionó el suero de pacientes con el síndrome
de antifosfolípidos a una dilución final de 1:50 y se incubaron durante 1 h a 37°C. Los sueros se
trataron previamente a 56°C durante 30 min para inactivar el complemento. Después de la
incubación los liposomas se lavaron con 12 ml del regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), a pH 7,
con CaCl_2 5 mM. Los liposomas se recuperaron por centrifugación en la ultracentrífuga Beckman
20 L8-M, a 202,000 xg durante 50 min a 18°C. A continuación se agregó a cada tubo como segundo
anticuerpo los anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG, IgA e IgM de humano conjugados a FITC,
para tener una dilución final de 1:200 y se incubó 1 h en la oscuridad. Al final de la incubación los
liposomas se lavaron como se indicó previamente. Por último las preparaciones de liposomas se
resuspendieron en 500 μl de la solución de FACS Flow (Beckton Dickinson Co.) filtrada con un
25 filtro Millipore de 0.22 μm de diámetro de poro. Esta suspensión se analizó por citofluorometría en
el citómetro FACScalibur, equipado con rayo láser de argón de 488 nm (Beckton Dickinson).

Las lecturas de fluorescencia se hicieron en el canal FL-1. El tamaño relativo o la
agregación de los liposomas se analizó en el canal FSC y la granularidad o complejidad de las
bicapas liposomales se analizó en el canal SSC. El análisis de 10,000 liposomas se hizo en escala
30 logarítmica con los siguientes detectores: FSC en E00, con un tamaño mínimo de detección de
liposomas a 52 V; SSC de 401 V y FL-1 de 748 V (Baeza y col., *op. cit.*, 1995). Los datos
obtenidos se analizaron con el programa Cellquest (Beckton Dickinson).

Como controles se determinó la fluorescencia, el tamaño relativo y la complejidad de la
bicapa liposomal de los liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato de yema de huevo (relación molar
35 2:1) que se trataron con CaCl_2 5 mM y que se incubaron con el suero de sujetos donadores del

banco de sangre y con el segundo anticuerpo que fueron anticuerpos de cabra anti-IgG, IgA e IgM de humano conjugados a FITC.

Se analizaron treinta sueros de donadores del banco de sangre, estos sueros no presentaron reacción con las partículas lipídicas, ya que las gráficas de fluorescencia obtenidas con los liposomas incubados con estos sueros fueron semejantes a las de autofluorescencia de los liposomas control, en Tris-NaCl, que se incubaron exclusivamente con CaCl_2 5 mM (h, Fig. 3D; y j, Fig. 3E del Ejemplo 2A). Estos sueros se mezclaron y se emplearon como un control negativo de la reacción inmune con partículas lipídicas, las gráficas de citofluorometría de este grupo de sueros son las que se presentan en a, Figs. 4A, D, G, J, M, P, S y V; en c, Figs. 4B, E, H, K, N, Q, T y W, y en e, Figs. 4C, F, I, L, O, R, U y X. Los valores de FSC obtenidos para estos liposomas (e, Figs. 4C, F, I, L, O, R, U y X) indican la ausencia de agregación liposomal por el tratamiento con los sueros humanos, porque son muy semejantes a los de los liposomas control indicados en l, Fig. 3F, del Ejemplo 2A.

El análisis de la inmunorreacción de los sueros de los pacientes con lupus eritematoso generalizado, con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario o con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario a lupus eritematoso generalizado, con los liposomas tratados con calcio, mostró una fluorescencia 20 a 40 veces mayor que la reacción de los sueros control con estos antígenos liposomales; en todos los casos con valores en la diferencia entre las poblaciones de liposomas, en escala logarítmica, $(D) \geq 0.5$ a $p < 0.001$ (Tabla 2). Como ejemplo de la reacción de sueros de pacientes con lípidos asociados en partículas lipídicas, se presentan los histogramas de fluorescencia de ocho sueros de pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG) (AC19 y AC20), con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario (SAAFP) (AC15, AC21 y AC30) o con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario a lupus eritematoso generalizado (LEG + SAAFP) (AC18, AC22 y AC31) en b, Fig. 4A; g, Fig. 4D; j, Fig. 4G; m, Fig. 4J; o, Fig. 4M; r, Fig. 4P; u, Fig. 4S; y en x, Fig. 4V. En los ocho casos la reacción entre los anticuerpos anti-partículas lipídicas de los sueros de los pacientes y las partículas lipídicas de los antígenos liposomales fue positiva, pero diferente entre sí y con respecto a la reacción del anticuerpo monoclonal H308 (comparar d, Fig. 4B; h, Fig. 4E; k, Fig. 4H; n, Fig. 4K; p, Fig. 4N; s, Fig. 4Q; v, Fig. 4T; así como y, Fig. 4W con d, Fig. 3B, del Ejemplo 2A).

Los valores de SSC (d, Fig. 4B; h, Fig. 4E; k, Fig. 4H; n, Fig. 4K; p, Fig. 4N; s, Fig. 4Q; v, Fig. 4T; así como y, Fig. 4W), parámetro en donde se analiza la complejidad de la bicapa liposomal y por lo tanto la presencia de lípidos asociados en partículas lipídicas, que fueron semejantes a los de liposomas control incubados con calcio (j, Fig. 3E, del Ejemplo 2A), mostraron la presencia de las partículas lipídicas que son las que dieron la reacción con los anticuerpos de los sueros de los pacientes.

En la reacción de los sueros de los pacientes con las partículas lipídicas de los antígenos liposomales, no hubo agregación liposomal que podría aumentar en forma inespecífica la fluorescencia registrada y dar un resultado falso positivo, porque los valores de FSC (f, Fig. 4C; i, Fig. 4F; l, Fig. 4I; ñ, Fig. 4L; q, Fig. 4O; t, Fig. 4R; w, Fig. 4U; y z, Fig. 4X) que muestran la agregación liposomal, fueron iguales después de la inmunorreacción con los sueros de los enfermos, que aquellos de los liposomas que fueron incubados con sueros de los donadores del banco de sangre (e, Figs. 4C, F, I, L, O, R, U y X) o de los que fueron incubados únicamente con calcio en ausencia de anticuerpos (l, Fig. 3 F, del Ejemplo 2A).

El método de citofluorometría liposomal tiene una sensibilidad 10 veces mayor que el método de ELISA-liposomal en la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas. Por lo que se aplica cuando se ha obtenido algún resultado dudoso con el método de ELISA-liposomal. Por ejemplo sueros como el AC27 que por ELISA-liposomal da un valor de unidades arbitrarias UA < 1.0, por citofluorometría liposomal da una prueba con un valor de D=0.51 que es claramente positivo.

Ejemplo 2C. Comparación al usar antígenos liposomales sin partículas lipídicas y sueros de enfermos con el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos en el método de citofluorometría liposomal.

Se emplearon liposomas "rígidos" formados de dipalmitoilfosfatidilcolina: fosfatidilcolina de yema de huevo:dipalmitoilfosfatidato (relación molar 1.2:0.8:1) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), pH 7, que incubados con BaCl₂ conservan la superficie lisa de bicapa, en ellos no hay la formación de partículas lipídicas porque la bicapa rígida que presentan no permite el movimiento de los lípidos requerido para formar las partículas lipídicas. Estos liposomas se incubaron con los sueros de los pacientes del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y como segundo anticuerpo se emplearon los anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG, IgA e IgM de humano conjugados a FITC, para tener una dilución final de 1:200.

Las gráficas de citofluorometría que se obtuvieron mostraron que los sueros de los pacientes no presentaron reacción con los liposomas "rígidos" incubados con BaCl₂ 5 mM (b, Fig. 5A; d, Fig. 5B; y f, Fig. 5C), porque fueron similares a las de los liposomas que no fueron tratados con BaCl₂ (a, Fig. 5A; c, Fig. 5B; y e, Fig. 5C). Las gráficas mostradas en las Figuras 5, corresponden a la reacción del suero AC15 que es de un paciente con síndrome de antifosfolípidos primario (SAAFP), esta reacción es representativa de la reacción de los sueros de los pacientes restantes indicados en la Tabla 2.

De los ejemplos anteriores se puede concluir que en otra modalidad preferida de la presente invención, un kit de diagnóstico para la detección por citofluorometría liposomal de anticuerpos anti-partículas lipídicas en el suero de sujetos con enfermedades relacionadas con anticuerpos

antifosfolípidos, incluye: un reactivo indicador, consistente en cuando menos liposomas con partículas lipídicas; cuando menos una solución reguladora de pH para permitir la reacción de la muestra del sujeto con dicho reactivo indicador; y medios fluorescentes para hacer evidente dicha reacción.

5 En esta modalidad preferida del kit de diagnóstico, la muestra de los sueros procedentes de los sujetos enfermos se hace reaccionar con el reactivo indicador de liposomas con partículas lipídicas.

 En una modalidad alternativa, el kit de diagnóstico incluye como parte de él mismo uno o más tubos(s) para centrifugación como recipiente(s) para el desarrollo de la reacción.

10 De igual manera, en otra modalidad alternativa este kit de diagnóstico puede incluir cuando menos un anticuerpo monoclonal anti-partículas, como control positivo de la reacción de anticuerpos específicos con los antígenos liposomales que llevan partículas lipídicas, y cuando menos una muestra de suero valorado procedente de un individuo sano, como control negativo de la reacción con el antígeno liposomal.

15 En otra modalidad alternativa la muestra de suero de un individuo sano puede obtenerse de una fuente externa, que sea proveniente de un individuo sano que no presente una enfermedad relacionada con anticuerpos antifosfolípidos.

Ejemplo 3. Detección directa de partículas lipídicas en células del sujeto con el anticuerpo monoclonal H308, por el método de inmunofluorescencia.

20 Se emplearon como antígenos células de cáncer de páncreas C5337. En una placa de cultivo celular de 24 pozos que contiene cubreobjetos estériles en cada uno de los pozos, se agregaron 1×10^6 células por cubreobjetos. La placa se incubó a 37°C en una atmósfera que contiene CO₂ al 5%. Cuando se obtuvo el 90% de confluencia celular, las células se lavaron dos veces con 2 ml del medio de cultivo DMEM incompleto y una vez con 2 ml de regulador de fosfatos de pH 7.4, estéril. A continuación se agregaron 200 µl del sobrenadante del hibridoma H308 que contiene el anticuerpo monoclonal H308 anti-partículas lipídicas, en dilución 1:10, y se incubó 1 h a 37°C, en presencia de CO₂ al 5%. Posteriormente los cultivos celulares se lavaron tres veces con 2 ml del regulador de fosfatos y se les agregaron 200 µl de una dilución 1:200 del
30 segundo anticuerpo de cabra anti-Fc de IgM de ratón conjugado a FITC; estas preparaciones se incubaron 1 h a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. A continuación se lavaron tres veces con 2 ml del regulador de fosfatos. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con VectaShield, se sellaron, se observaron y se fotografiaron en el microscopio con epifluorescencia y óptica de Nomarski (Nikon Optiphot-2).

35 Con esta metodología, las células neoplásicas en cultivo se marcaron con el anticuerpo monoclonal H308. En las células se observaron zonas con una fuerte intensidad de fluorescencia

localizada en pequeños puntos, en ocasiones por encima del núcleo celular (1, Fig. 6). En algunos casos la fluorescencia se localizó en los sitios de unión entre las células (2, Fig. 6). En otros casos las células se marcaron en toda la superficie, estas células presentaron una morfología redonda (3, Fig. 6), como la que corresponde a células no adheridas a la placa de cultivo que pueden estar en apoptosis o en muerte celular, o que pueden encontrarse no adheridas porque están en proceso de división celular. Esta inmunotinción muestra la reacción del anticuerpo monoclonal con partículas lipídicas presentes en las membranas de las células C5377. Para confirmar que la inmunorreacción observada fue con partículas lipídicas celulares, el anticuerpo monoclonal H308 fue adsorbido con liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (relación molar 2;1) incubados con CaCl_2 5 mM, por lo cual llevan partículas lipídicas. Después de esta adsorción el sobrenadante del hibridoma H308 ya no mostró reacción con las células C5337, porque se eliminaron los anticuerpos anti-partículas lipídicas que contenía.

Como controles en este estudio las células se incubaron únicamente con el segundo anticuerpo conjugado a FITC o bien con el anticuerpo monoclonal inespecífico, del isotipo IgM, dirigido contra una proteína membranal de *Trichinella spiralis*. En ambos casos no hubo reacción de estos anticuerpos con las células neoplásicas, ya que en las preparaciones no se observó fluorescencia que mostrara la reacción inmune.

Estos estudios muestran que el anticuerpo monoclonal H308 además de reaccionar con las partículas lipídicas de modelos membranales como los liposomas, reacciona con partículas lipídicas de membranas celulares en cultivo. Estas células representan un antígeno natural a diferencia de los liposomas que son un modelo experimental de la membrana celular. Asimismo, cuando se han usado cortes de un órgano, como la placenta humana; el anticuerpo monoclonal H308 reaccionó con las membranas celulares de dicho órgano. Esta reacción fue diferente a lo largo de los 9 meses de vida de dicho órgano y se detectó una mayor cantidad de partículas lipídicas en las etapas finales del embarazo. La reacción observada muestra que el anticuerpo H308 reacciona con partículas lipídicas presentes en forma natural en éste órgano.

De acuerdo con lo anterior, la detección de partículas lipídicas en las membranas de células puede emplearse para caracterizar los diferentes estados funcionales por los que pasan las células durante las diferentes etapas del ciclo celular, incluyendo el proceso de apoptosis, o muerte celular programada.

Ejemplo 3A. Detección directa de partículas lipídicas en células del sujeto con el anticuerpo monoclonal H308, por el método de citofluorometría.

Se colocaron 100,000 plaquetas en 100 μl de regulador de Tris-NaCl (10 mM, 135 mM), pH 7, adicionado de glucosa 11 mM, en tubos de poliestireno de 8 x 75 mm. A cada una de estas alícuotas se les adicionó el sobrenadante del hibridoma H308, que genera un anticuerpo

monoclonal anti-partículas lipídicas, a una dilución final de 1:100 y se les agregó adenosina difosfato (ADP) a una concentración final de 5 μ M y se incubaron durante 30 min a 37°C. Después de la incubación las plaquetas se lavaron con 4 ml del regulador de Tris-NaCl (10 mM, 135 mM), a pH 7, conteniendo glucosa 11 mM. Las plaquetas se recuperaron por centrifugación a 200 x g durante 5 min. A continuación se agregó a cada tubo como segundo anticuerpo los anticuerpos de cabra anti-Fc de IgM de ratón conjugados a FITC, para tener una dilución final de 1:200 y se incubó 1 h en la oscuridad. Al final de la incubación las plaquetas se lavaron como se indicó previamente. Por último las preparaciones de plaquetas se resuspendieron en 500 μ l de la solución de FACS Flow (Beckton Dickinson Co.) filtrada con un filtro Millipore de 0.22 μ m de diámetro de poro.

Esta suspensión de plaquetas se analizó por citofluorometría en el citómetro FACScalibur, equipado con rayo láser de argón de 488 nm (Beckton Dickinson).

Las lecturas de fluorescencia se hicieron en el canal FL-1. El tamaño relativo y/o la agregación de las plaquetas se analizó por la difracción del rayo láser en el canal FSC y la granularidad o complejidad de las membranas de las plaquetas se analizó por la refracción y la reflexión del láser en el canal SSC. El análisis de 10,000 plaquetas se hizo con los siguientes detectores: FSC en E00, en modo lineal con una ganancia de 5.0 y con un tamaño mínimo de detección de plaquetas a 52 V; SSC de 450 V y FL-1 de 700 V, ambos en escala logarítmica (Baeza y col., *op. cit.*, 1995). Los datos obtenidos se analizaron con el programa Cellquest (Beckton Dickinson).

Como control se utilizaron plaquetas sin activar con el ADP, las cuales fueron tratadas como se describió anteriormente.

El anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas H308, presentó reactividad con las plaquetas que fueron activadas con ADP, lo cual ocasionó un incremento de 10 veces en la fluorescencia con respecto a las plaquetas que no fueron activadas. Los histogramas de fluorescencia que se obtuvieron son semejantes a los presentados en a, y en m, Fig. 4J, del Ejemplo 2B, para las plaquetas sin activar y activadas con ADP, respectivamente. El valor de la diferencia entre estas dos poblaciones en escala logarítmica fue de $D=0.55$ a $p<0.001$. Asimismo, las gráficas correspondientes a los valores de complejidad de las membranas de las plaquetas (SSC) y de agregación de las plaquetas activadas (FSC) fueron como las presentadas en n, Fig. 4K; y ñ, Fig.4L, respectivamente; en donde se indica la mayor complejidad de las membranas durante la activación, así como la falta de agregación plaquetaria.

Estos resultados muestran la detección de partículas lipídicas en plaquetas, las cuales por ser fragmentos celulares presentan una membrana que permite el estudio de las características estructurales y funcionales de este organelo celular.

La metodología de este Ejemplo puede usarse también para detectar partículas lipídicas en células aisladas, como eritrocitos y leucocitos que se encuentren en diferentes estados fisiológicos. Lo cual permitirá caracterizar los estados fisiológicos de las células por la mayor o menor cantidad de partículas lipídicas presentes en sus membranas celulares. Este conocimiento puede contribuir a mantener a las células en un estado funcional más adecuado y por lo tanto puede contribuir a la prevención de enfermedades.

Ejemplo 3B. Detección directa de partículas lipídicas en células del sujeto con anticuerpos anti-partículas lipídicas de sueros de enfermos con el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, por el método de ELISA-celular.

Se emplearon como antígenos células de cáncer de páncreas C5337. La línea celular se sembró en los pozos de una placa de cultivo celular de 96 pozos y se incubó a 37°C en una atmósfera que contiene CO₂ al 5%, hasta una confluencia celular del 100%. A los cultivos obtenidos se les agregaron 200 µl de una solución de bloqueo que contiene regulador de Tris-NaCl (10 mM, 135 mM), a pH 7, suero fetal de ternera al 5%, y CaCl₂ 5 mM y se incubó durante 30 min a 37°C. A continuación se eliminó esta solución y se agregaron 100 µl de los sueros de los enfermos con el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos o de los donadores del banco de sangre a una dilución final de 1:50. Los cultivos se incubaron por 30 min a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. Posteriormente, estos cultivos se lavaron tres veces con 200 µl de la solución de bloqueo durante 5 min en cada lavado. Después se les agregaron 100 µl de una dilución 1:2000 del segundo anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG, IgA e IgM de humano conjugado a peroxidasa y diluido en la solución de bloqueo y la placa se incubó 30 min a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. A continuación se lavó como antes se ha indicado y se agregaron 100 µl de los sustratos de la peroxidasa a cada pozo y la placa se incubó durante 20 min a 37°C. Finalmente se agregaron 50 µl de ácido sulfúrico 2.5 M para detener la reacción y se leyó la absorbencia a 492 nm en el lector de ELISA Labsystems Multiskan modelo MS.

Los sueros de los 30 enfermos estudiados en los Ejemplos 1 y 2B presentaron reacción con las células neoplásicas. Las lecturas de absorbencia a 492 nm dieron valores mayores a una unidad arbitraria. Para confirmar que esta reacción fue con las partículas lipídicas presentes en las membranas de dichas células, los sueros de los enfermos se adsorbieron con liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (relación molar 2;1) incubados con CaCl₂ 5 mM, por lo cual llevan partículas lipídicas. Después de esta adsorción los sueros ya no mostraron reacción con las células C5337, porque se eliminaron de dichos sueros los anticuerpos anti-partículas lipídicas.

En la Figura 7 se presentan los resultados obtenidos con algunos de los sueros, específicamente los sueros AC15, AC30 y AC33 que corresponden a pacientes con síndrome de antifosfolípidos primario, los sueros AC19 y AC29 de pacientes con lupus eritematoso

generalizado y el suero AC34 de un paciente con síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario a lupus eritematoso generalizado. Se presentan las gráficas de barras obtenidas de la reacción directa de estos sueros con las células, así como de la reacción de estos sueros después de su adsorción con los liposomas que llevan partículas lipídicas. En la Figura 7, se observa como se elimina la reacción de estos sueros con los antígenos celulares porque se eliminaron los anticuerpos antipartículas lipídicas que presentaban.

En la Figura 7 la línea indica el límite por arriba del cual las reacciones de los sueros con los antígenos celulares se consideraron positivas.

Estos experimentos son muy importantes, debido a que muestran que los anticuerpos antipartículas lipídicas de los sueros de los enfermos, los cuales fueron detectados con modelos membranales experimentales como los liposomas, mostraron también reacción con las partículas lipídicas de antígenos celulares, los cuales representan realmente un antígeno natural.

Ejemplo 3C. Detección directa de partículas lipídicas en células del sujeto con anticuerpos antipartículas lipídicas de sueros de enfermos con el síndrome de antifosfolípidos, por el método de inmunofluorescencia.

Esta detección se hizo como se indicó en el Ejemplo 3, con la diferencia de que las células de cáncer de páncreas C5337 se trataron con los sueros de los enfermos con el síndrome de antifosfolípidos que llevan los anticuerpos anti-partículas lipídicas. Estos sueros se usaron en dilución 1:50 y como segundo anticuerpo se emplearon anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG, IgA e IgM humanos conjugados a FITC.

Los cultivos de células neoplásicas se marcaron con los anticuerpos anti-partículas lipídicas de los sueros en una forma similar a como se marcaron las células que se muestran en la Figura 6 del Ejemplo 3.

Por otra parte, la metodología de este Ejemplo puede aplicarse en forma alternativa a la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en sueros de enfermos, cuando estos aun no han sido detectados por los procedimientos indicados en los Ejemplos 1 y 2B.

De los ejemplos anteriores puede concluirse que en otra modalidad preferida de la presente invención, un kit de diagnóstico para la detección directa de partículas lipídicas en antígenos celulares incluye: cuando menos un reactivo indicador, consistente en cuando menos un anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas; cuando menos una solución reguladora de pH como medio para permitir la reacción; y medios fluorescentes o enzimáticos para hacer evidente la reacción.

En esta modalidad preferida del kit de diagnóstico, la muestra de células procedentes de los sujetos enfermos se hace reaccionar con el anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas, es decir, con el reactivo indicador.

En una modalidad alternativa del kit de diagnóstico, en lugar del anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas, puede utilizarse para la detección de las partículas lipídicas en las células procedentes de sujetos enfermos, por lo menos un suero de un paciente en el cual se hayan demostrado previamente anticuerpos anti-partículas lipídicas.

- 5 En una modalidad alternativa, el kit de diagnóstico incluye como parte de él mismo una o más placa(s) para cultivo celular, o tubos para centrifuga como recipiente(s) para el desarrollo de la reacción.

- 10 En otra modalidad preferida de la presente invención, un kit para la detección de partículas lipídicas en células en diferentes estados fisiológicos provenientes de un sujeto humano o animal, incluye: cuando menos un reactivo indicador, consistente en cuando menos un anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas; cuando menos una solución reguladora de pH como medio para permitir la reacción; y medios fluorescentes o enzimáticos para hacer evidente la reacción.

- 15 En esta modalidad preferida del kit de detección, la muestra de células en diferentes estados fisiológicos se hace reaccionar con el anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas, es decir, con el reactivo indicador.

En una modalidad alternativa, el kit de detección de partículas lipídicas en células en diferentes estados fisiológicos incluye como parte de él mismo una o más placa(s) para cultivo celular, o tubos para centrifuga como recipiente(s) para el desarrollo de la reacción.

- 20 **Ejemplo 4.** Obtención de ratones productores de anticuerpos anti-partículas lipídicas, por inmunización con liposomas que llevan partículas lipídicas inducidas por manganeso.

- 25 Se inmunizó un grupo de 10 ratones hembras de dos meses de edad de la cepa singénica BALB/c por vía intraesplénica con 100 µg de liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato de yema de huevo (relación molar 2:1) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), a pH 7, que llevan partículas lipídicas inducidas con MnCl₂ 5 mM. Se hicieron dos retos antigénicos por vía intraesplénica por el método descrito por Nilsson y col. (op. cit. 1987), con intervalos de siete días. Posteriormente los ratones hembras se inmunizaron, con la misma dosis de liposomas, cuatro veces por vía intraperitoneal a intervalos de dos semanas. Después de siete días de la última
- 30 inmunización, los ratones hembras se sangraron del seno orbital para analizar la presencia de anticuerpos anti-partículas lipídicas en los sueros obtenidos.

- 35 El análisis de los sueros de los ratones se hizo por citofluorometría liposomal como se indicó en el ejemplo 2B. Se emplearon como antígenos liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (relación molar 2:1) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), a pH 7, que contienen 0.1 µmol de fosfatidato y que llevan partículas lipídicas, porque fueron tratados con MnCl₂ 5 mM. Estos liposomas se emplearon como controles, por lo cual se determinó su autofluorescencia, la

complejidad de sus bicapas lipídicas (SSC) y el tamaño o la agregación liposomal (FSC) por citofluorometría en el citómetro FACScalibur, equipado con rayo láser de argón de 488 nm (Beckton Dickinson). El análisis de 10,000 liposomas se hizo en escala logarítmica con los siguientes detectores: FSC en E00, con un tamaño mínimo de detección de liposomas a 52V; SSC de 401 V y FL-1 de 748 V (Baeza y col., *op. cit.*, 1995). Los datos obtenidos se analizaron con el programa Cellquest (Beckton Dickinson).

La autofluorescencia y la complejidad de las bicapas lipídicas de los liposomas incubados con $MnCl_2$ (Fig. 8A) no se modificaron cuando estos liposomas se incubaron además con el segundo anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG, IgM e IgA de ratón conjugado a FITC (Fig. 8B). Esto es debido a que el segundo anticuerpo no se une por sí mismo a los liposomas.

Para analizar la reacción inmune, los sueros de los ratones se incubaron con los antígenos liposomales y para detectar la reacción inmune se emplearon como segundo anticuerpo los anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG, IgM e IgA de ratón conjugados a FITC. Los sueros analizados fueron aquellos obtenidos de los ratones antes de que fueran inmunizados, así como los obtenidos después de la inmunización con los antígenos liposomales indicados.

Al analizar los sueros de los ratones antes de que fueran inmunizados, se encontró que estos sueros no presentaron reacción con las partículas lipídicas, ya que las gráficas de fluorescencia y de complejidad de las bicapas lipídicas que se obtuvieron fueron semejantes a aquellas de los liposomas control incubados únicamente con manganeso (Fig. 8A). Estos sueros se mezclaron y se emplearon como un control negativo de la inmunorreacción de los sueros con las partículas lipídicas, los datos de estas mezclas de sueros se presentan en la Figura 8C.

El análisis de la reacción de los sueros de los ratones después de inmunizarlos con los antígenos liposomales tratados con manganeso, mostró una fluorescencia 10 a 100 veces mayor (Figs. 8D, 8E y 8F) que la reacción de los sueros control (Fig. 8C), con valores de $D \geq 0.5$ a $p < 0.001$. De los ratones inmunizados el 60% produjo anticuerpos anti-partículas lipídicas. Como ejemplo se presentan las gráficas de fluorescencia y de complejidad de las bicapas lipídicas de la reacción del suero de tres ratones inmunes, RB11, RB14 y RB17 (Figs. 8 D, 8E y 8F). En los tres casos la reacción entre los anticuerpos de los sueros de estos ratones inmunizados y las partículas lipídicas en los antígenos liposomales fue positiva, pero diferente entre sí y con valores de $D=0.9$, $D=0.91$ y $D=0.79$, respectivamente. Los valores de complejidad de las bicapas lipídicas (SSC) (Figs. 8 D, 8E y 8F), que fueron semejantes a los de los liposomas control incubados con manganeso (Fig. 8 A), mostraron la presencia de las partículas lipídicas en los antígenos liposomales, que son las que dieron la reacción con los anticuerpos de los sueros de los ratones.

La posible agregación de los liposomas se analizó en las Figuras 9A-9F, en donde se presentan las gráficas de la difracción del rayo láser en el canal FSC y de la refracción y la reflexión del láser en el canal SSC. En la reacción de los sueros de los ratones que fueron

004080" 5522E969

inmunizados con las partículas lipídicas de los antígenos liposomales, no hubo agregación liposomal que podría aumentar en forma inespecífica la fluorescencia registrada y dar un resultado falso positivo. Debido a que los valores de FSC que muestran la agregación liposomal, fueron iguales después de la inmunorreacción con los sueros (Figs. 9D-9F), que aquellos de los liposomas control incubados únicamente con manganeso (Fig. 9A), o de aquellos que solamente se incubaron con el segundo anticuerpo que son anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG, IgM e IgA de ratón conjugados a FITC (Fig. 9B), o con los sueros de los ratones antes de que fueran inmunizados (Fig. 9C). En las Figuras 9A-9F también se muestran los valores de SSC, que indican la presencia de las partículas lipídicas en los antígenos liposomales, en forma similar a como se describió en las Figuras 8A-8F.

En estos ratones inmunizados con los liposomas que llevan partículas lipídicas inducidas por manganeso, se detectaron en forma posterior a los anticuerpos anti-partículas lipídicas, anticuerpos anti-cardiolipina, anti-nucleares y anticoagulantes. El ratón que dio la reacción más alta, el RB14 con un valor de $D=0.91$, se usó en la obtención de los anticuerpos monoclonales.

Ejemplo 4A. Obtención de ratones productores de anticuerpos anti-partículas lipídicas, por tratamiento con liposomas que llevan partículas lipídicas inducidas por los fármacos inductores cloropromacina o procainamida.

Se inmunizó un grupo de 10 ratones hembras de dos meses de edad de la cepa singénica BALB/c por vía intraesplénica con 100 μg de liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato de yema de huevo (relación molar 2:1) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), a pH 7, que contienen 0.1 μmol de fosfatidato y que llevan partículas lipídicas inducidas por el fármaco inductor procainamida 8 mM. La inmunización se hizo como se indicó en el Ejemplo 4. Después de siete días de la última inmunización, los ratones hembras se sangraron del seno orbital para analizar la presencia de anticuerpos anti-partículas lipídicas en los sueros obtenidos.

El análisis de los sueros de los ratones se hizo por citofluorometría liposomal como se indicó en el Ejemplo 4. Se emplearon como antígenos liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (relación molar 2:1) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), a pH 7, que contienen 0.1 μmol de fosfatidato y que llevan partículas lipídicas, porque fueron tratados con el fármaco inductor procainamida 8 mM. Estos liposomas se emplearon como controles, por lo cual se determinó su autofluorescencia, la complejidad de sus bicapas lipídicas (SSC) y el tamaño o la agregación liposomal (FSC) por citofluorometría en el citómetro FACScalibur, equipado con rayo láser de argón de 488 nm (Beckton Dickinson). El análisis de 10,000 liposomas se hizo como antes se indicó en el Ejemplo 4.

La autofluorescencia y la complejidad de las bicapas lipídicas de los liposomas incubados con el fármaco inductor procainamida (Fig. 10A) no se modificaron cuando estos liposomas se

incubaron solamente con el segundo anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG, IgM e IgA de ratón conjugado a FITC (Fig. 10 B). Esto es debido a que el segundo anticuerpo no se une por si mismo a los liposomas.

Los sueros de los ratones se incubaron con los antígenos liposomales y para detectar esta
5 reacción inmune se emplearon como segundo anticuerpo los anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG, IgM e IgA de ratón conjugados a FITC. Los sueros analizados fueron aquellos obtenidos de los ratones antes de que fueran inmunizados, así como los obtenidos después de la inmunización con los antígenos liposomales indicados.

Al analizar los sueros de los ratones antes de que fueran inmunizados, se encontró que
10 estos sueros no presentaron reacción con las partículas lipídicas, ya que las gráficas de fluorescencia y de complejidad de las bicapas lipídicas que se obtuvieron fueron semejantes a aquellas de los liposomas control incubados únicamente con procainamida (Fig. 10A). Estos sueros se mezclaron y se emplearon como un control negativo de la inmunorreacción de los sueros de los ratones con las partículas lipídicas (Fig. 10C).

El análisis de la reacción de los sueros de los ratones después de inmunizarlos con los
15 antígenos liposomales tratados con el fármaco inductor procainamida (Figs. 10D-10F), mostró una fluorescencia 10 a 100 veces mayor que la reacción de los sueros control (Fig. 10C), con valores de $D \geq 0.5$ a $p < 0.001$. De los ratones inmunizados el 70% produjo anticuerpos anti-partículas lipídicas. Como ejemplo se presentan las gráficas de fluorescencia y de complejidad de las
20 bicapas lipídicas de la reacción del suero de tres ratones inmunes, RF11, RF14 y RF17 (Figs. 10D-10F). En los tres casos la reacción entre los anticuerpos de los sueros de estos ratones y las partículas lipídicas en los antígenos liposomales fue positiva, pero diferente entre sí y con valores de $D=0.8$, $D=0.72$ y $D=0.67$ respectivamente. Los valores de complejidad de las bicapas lipídicas (SSC) (Figs. 10D-10F), semejantes a los de los liposomas control incubados únicamente con
25 procainamida (Fig. 10A), mostraron la presencia de las partículas lipídicas en los antígenos liposomales, que son las que dieron la reacción con los anticuerpos de los sueros de los ratones.

La posible agregación de los liposomas se descartó porque los valores de FSC fueron
iguales después de la inmunorreacción con los sueros, que aquellos de los liposomas control incubados únicamente con procainamida, o de aquellos que se incubaron también con el segundo
30 anticuerpo que son anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG, IgM e IgA de ratón conjugados a FITC, o con los sueros de los ratones antes de que fueran inmunizados, en forma similar a como se describió en las Figuras 9 A-F del Ejemplo 4.

Resultados similares a los mostrados en las Figuras 10 se obtuvieron cuando los ratones
fueron inmunizados con liposomas que llevan partículas lipídicas inducidas por el fármaco inductor
35 cloropromacina.

En estos ratones inmunizados con los liposomas que llevan partículas lipídicas inducidas por los fármacos cloropromacina o procainamida, se detectaron en forma posterior a la aparición de los anticuerpos anti-partículas lipídicas, los anticuerpos anti-cardiolipina, anti-nucleares y anticoagulantes como se indicó para ratones inmunizados con liposomas que contienen partículas lipídicas inducidas por manganeso del Ejemplo 4. Además, en estos ratones se ha demostrado la presencia de depósitos de complejos inmunes en diferentes órganos y en ellos se presentó alopecia y se desarrollaron lesiones en la cara en forma de ala de mariposa, como las que se han descrito en el lupus eritematoso generalizado en el humano. En la Figura 11 se presenta la fotografía de un ratón BALB/c hembra de siete meses de edad que fue tratado con liposomas que llevan partículas lipídicas inducidas por cloropromacina, en donde se pueden observar las lesiones que presenta en forma de ala de mariposa en la cara.

Este modelo experimental indica que antígenos que llevan partículas lipídicas inducidas con cloropromacina o con procainamida fueron más eficientes en desarrollar en los ratones BALB/c no solo anticuerpos anti-partículas lipídicas sino un cuadro patológico que es más parecido al que se presenta en el humano.

Ejemplo 4B. Obtención de ratones productores de anticuerpos anti-partículas lipídicas, por tratamiento con los fármacos cloropromacina o procainamida.

Se hizo una modificación al esquema de tratamiento de los ratones BALB/c indicado en el Ejemplo 4A, ya que los fármacos cloropromacina o procainamida se administraron directamente a los ratones en ausencia de los antígenos liposomales.

Se trató un grupo de 10 ratones hembras de dos meses de edad de la cepa singénica BALB/c por vía intramuscular cada 24 hs, con 3 mg/Kg de peso del fármaco cloropromacina 10 mg/Kg de peso del fármaco procainamida, durante dos meses. Estas dosis de los fármacos son similares a las que se administran en el tratamiento médico de humanos, en trastornos psicóticos y maníacos para la cloropromacina y las que se usaban para el tratamiento de arritmias cardíacas en el caso de la procainamida. Después de siete días de la última dosis, los ratones hembras se sangraron del seno orbital para analizar la presencia de anticuerpos anti-partículas lipídicas en los sueros obtenidos.

El análisis de los sueros de los ratones se hizo por citofluorometría liposomal como se indicó en el Ejemplo 4. Se emplearon como antígenos liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (relación molar 2:1) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), a pH 7, que contienen 0.1 μ mol de fosfatidato y que llevan partículas lipídicas inducidas por el fármaco inductor procainamida 8 mM. Los sueros de los ratones se incubaron con los antígenos liposomales y para detectar la reacción inmune se emplearon como segundo anticuerpo los anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG, IgM e IgA de ratón conjugados a FITC. Los sueros analizados fueron aquellos obtenidos de los ratones antes

de que fueran tratados con los fármacos, así como los obtenidos después del tratamiento con dichos fármacos.

El análisis de la reacción de los sueros de los ratones después del tratamiento con el fármaco procainamida, mostró una fluorescencia 4 veces mayor (b, Fig. 12 A; g, Fig. 12D; y j, Fig. 12G) que la reacción de los sueros antes del tratamiento (a, Figs. 12 A, D y G), con valores de $D \geq 0.5$ a $p < 0.001$. De los ratones tratados el 50% produjo anticuerpos anti-partículas lipídicas. Como ejemplo se presentan las gráficas de fluorescencia de la reacción del suero de tres ratones tratados RP37, RP38 y RP39, (b, Fig. 12 A; g, Fig. 12 D; y j, Fig. 12 G). En los tres casos la reacción entre los anticuerpos de los sueros de estos ratones y las partículas lipídicas en los antígenos liposomales fue positiva, pero diferente entre sí y con valores de $D=0.58$ y $D=0.68$ y $D=0.8$ respectivamente. Los valores de complejidad de las bicapas lipídicas (SSC) (d, Fig. 12 B; h, Fig. 12E; y k, Fig. 12H), mostraron la presencia de las partículas lipídicas en los antígenos liposomales, que son las que dieron la reacción con los anticuerpos de los sueros de estos ratones.

Una posible agregación de los liposomas fue descartada porque los valores de FSC fueron similares después de la inmunorreacción con los sueros (f, Fig. 12C; i, Fig. 12 F; y l, Fig. 12 I), que aquellos de los liposomas control incubados únicamente con manganeso de la Figura 9 A del Ejemplo 4, o de aquellos que se incubaron con los sueros de los ratones antes de que fueran tratados con los fármacos (e, Figs. 12C, F e I).

En estos ratones también se detectaron en forma posterior a los anticuerpos anti-partículas lipídicas, los anticuerpos anti-cardiolipina, anti-nucleares y anticoagulantes, así como la presencia de complejos inmunes en diferentes órganos. En estos ratones se presentó alopecia y las lesiones en la cara en forma de ala de mariposa descritas en el Ejemplo 4A.

Resultados similares a los mostrados en las gráficas de las Figuras 12, se obtuvieron cuando los ratones fueron tratados con el fármaco inductor de partículas lipídicas cloropromacina.

Estos resultados indican que los fármacos cloropromacina y procainamida inducen la formación de partículas lipídicas en las membranas de las células de los ratones, lo cual posteriormente da origen a la obtención de anticuerpos anti-partículas lipídicas en dichos ratones y al desarrollo de una patología parecida al síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario a lupus eritematoso generalizado humano. La formación de partículas lipídicas por estos fármacos se ha demostrado en los liposomas que son modelos experimentales de la membrana celular, por resonancia magnética nuclear (Baeza y col., *op. cit.*, 1995; Aguilar, *op. cit.*, 1997; Aguilar y col., *op. cit.*, 1999).

Ejemplo 4C. Obtención de ratones productores de anticuerpos anti-partículas lipídicas, por inmunización pasiva con el anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas H308.

Se trató un grupo de 10 ratones hembras de dos meses de edad de la cepa singénica BALB/c por vía intraperitoneal cada semana, con 1 µg del anticuerpo monoclonal H308, durante ocho semanas. Después de siete días de la última dosis, los ratones hembras se sangraron del seno orbital para analizar la presencia de anticuerpos anti-partículas lipídicas en los sueros obtenidos.

5 El análisis de los sueros de los ratones se hizo por citofluorometría liposomal como se indicó en el Ejemplo 4. Se emplearon como antígenos liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (relación molar 2:1) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), a pH 7, que contenían 0.1 µmol de fosfatidato y que llevan partículas lipídicas inducidas por CaCl₂ 5 mM. Los sueros de los ratones se incubaron con los antígenos liposomales y para detectar la reacción inmune se emplearon como
10 segundo anticuerpo los anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG, IgM e IgA de ratón conjugados a FITC. Los sueros analizados fueron aquellos obtenidos de los ratones antes de que fueran tratados con el anticuerpo monoclonal H308, así como los obtenidos después del tratamiento con dicho anticuerpo.

El análisis de la reacción de los sueros de los ratones después de la inmunización pasiva
15 con el anticuerpo monoclonal H308 mostró la presencia de anticuerpos anti-partículas lipídicas en dichos sueros, ya que los análisis de citofluorometría que se obtuvieron fueron similares a los descritos en las Figuras 8, 9, 10 y 12. Además, en estos ratones también se detectaron en forma posterior a los anticuerpos anti-partículas lipídicas, los anticuerpos anti-cardiolipina, anti-nucleares y anticoagulantes. Adicionalmente, en estos ratones también se ha demostrado la presencia de
20 depósitos de complejos inmunes en diferentes órganos y en ellos se presentó alopecia y se desarrollaron lesiones en la cara en forma de ala de mariposa, similares a las que se formaron en los ratones tratados con los fármacos clorpromacina o procainamida, o con liposomas que llevan partículas lipídicas inducidas por estos fármacos. De los ratones tratados por inmunización pasiva con el anticuerpo monoclonal H308 el 80% produjo anticuerpos anti-partículas lipídicas así como
25 el cuadro patológico indicado.

Estos resultados indican la participación directa de los anticuerpos anti-partículas lipídicas en el desarrollo de una patología en los ratones que es muy parecida al síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario a lupus eritematoso generalizado que se presenta en el humano. Por lo cual un posible tratamiento de estas enfermedades sería por la inhibición de los anticuerpos anti-
30 partículas lipídicas y/o por la estabilización de las membranas celulares que impida la formación de las partículas lipídicas, como se indica posteriormente.

Ejemplo 5. Obtención de hibridomas por fusión de células P3x63Ag8U.1 con células del bazo de un ratón BALB/c productor de anticuerpos anti-partículas lipídicas.

35 El bazo de un ratón hembra BALB/c productor de anticuerpos anti-partículas lipídicas del Ejemplo 4, fue extraído en condiciones de esterilidad y se colocó en una caja de petri,

agregándosele 6 ml de medio DMEM incompleto. Con unas pinzas de puntas romas, se disgregó hasta obtener una suspensión celular, la cual se transfirió a un tubo falcon de 15 ml y se dejó en reposo para que sedimentaran los residuos más gruesos. A continuación la suspensión celular se transfirió a otro tubo falcon y se centrifugó a 17 x g durante 7 min. Posteriormente se decantó y las células se resuspendieron por agitación suave y se diluyeron por la agregación gota a gota de 10 ml de medio DMEM incompleto. La preparación celular se centrifugó como ya se indicó, se decantó y se le agregaron 4 ml de NH_4Cl 0.16 M para lisar los eritrocitos. En este paso el tubo se incubó a 37°C y se rotó con suavidad durante 4 min. Posteriormente se agregaron 6 ml de medio DMEM incompleto y se centrifugó a 17 x g por 7 min, se decantó y el sedimento celular se resuspendió en 10 ml de medio DMEM incompleto que se mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso (Köhler y Milstein, 1975. Nature 256:495.497).

Por otra parte, las células de mieloma P3x63Ag8U.1 se colectaron de las cajas de cultivo en tubos falcon y se tomaron alícuotas que fueron tratadas con el colorante azul de tripano y se contaron, al igual que las células del bazo del ratón BALB/c inmune, en una cámara de Neubauer. La viabilidad de ambos tipos celulares fue mayor al 85%. Las poblaciones celulares P3x63Ag8U.1 y de bazo del ratón inmune se centrifugaron a 17 x g durante 5 min. Después se mezclaron en una proporción celular 1:1, con 36×10^6 células de cada tipo y se lavaron con 10 ml de medio DMEM incompleto. Una vez hecho esto, se decantó, se eliminó el medio de cultivo y el sedimento se disgregó con suavidad. Posteriormente se agregó gota a gota, durante 1 min, 1 ml de la solución de polietilenglicol 4000, se agitó manualmente durante 1.5 min y se añadió en 30 seg 1 ml de medio DMEM incompleto, con rotación lenta del tubo. A continuación, se agregaron 3 ml de medio DMEM incompleto durante 30 seg con rotación del tubo, después se agregaron 16 ml del mismo medio durante 1.5 min y con agitación suave, finalmente el volumen se llevó a 40 ml y se incubó sin agitación durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 17 x g durante 5 min. Se decantó y se lavó una vez con 40 ml de medio DMEM incompleto. El sedimento se resuspendió en 30 ml del medio de selección DMEM-HAT, se tomaron alícuotas de 100 μl de esta suspensión celular y se colocaron en los 96 pozos de cada una de tres placas de cultivo celular que 24 h antes de la fusión se habían sembrado con macrófagos. Las placas de cultivo se incubaron a 37°C, en atmósfera con 5% de CO_2 . A los 5 y 8 días después de la fusión los híbridos se alimentaron con 50 μl de medio DMEM-HAT, y a los 11 días se les cambió el medio por 100 μl de DMEM-HAT.

Cuando los hibridomas se desarrollaron, se tomaron los sobrenadantes y se analizaron por el método de ELISA-liposomal. De todos los hibridomas que dieron resultados positivos se tomaron muestras celulares y se congelaron a -70°C en nitrógeno líquido. Posteriormente se eligieron 10 hibridomas que dieron la inmunorreacción con títulos de UA más altos (Tabla 3) y se transfirieron por duplicado a placas de cultivo celular de 24 pozos, para obtener mayor cantidad de

sobrenadantes y determinar la presencia de anticuerpos anti-partículas lipídicas por el método de ELISA-liposomal. Los hibridomas que dieron los títulos más altos de anticuerpos anti-partículas lipídicas se volvieron a clonar en placas de cultivo celular de 96 pozos. Los híbridos que se desarrollaron, se analizaron para detectar aquellos productores de anticuerpos anti-partículas lipídicas por el método de ELISA-liposomal, y los que dieron los títulos más altos de estos anticuerpos se cultivaron en botellas de 250 ml para la obtención masiva de los sobrenadantes que contienen dichos anticuerpos.

Tabla 3

Hibridomas productores de anticuerpos anti-partículas lipídicas.

Nombre del hibridoma	Unidades arbitrarias	Nombre del hibridoma	Unidades Arbitrarias
H40	26	H120	36
H65	32	H121	35
H70	3	H176	42
H90	22	H200	30
H110	23	H308	48

Ejemplo 6. Detección de la inhibición del anticuerpo monoclonal H308 anti-partículas lipídicas con haptenos fosforilados, por el método de ELISA-liposomal.

Estos estudios se llevaron a cabo con una modificación del método de ELISA-liposomal con los liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (relación molar 2:1), en donde el contenido de fosfatidato es 0.1 μmol , que se incubaron con CaCl_2 5 mM como antígenos. Se colocaron 100 μl de la suspensión de liposomas en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), a pH 7, en cada pozo de una inmunoplaaca de ELISA de poliestireno, de 96 pozos de fondo plano y de alta propiedad de unión a antígenos lipídicos (Costar Co. Cambridge, USA). Esta inmunoplaaca se incubó 1 h a temperatura ambiente. A continuación se hizo el bloqueo de la inmunoplaaca como se indicó en el Ejemplo 1 y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente las soluciones de bloqueo se retiraron por succión, y se agregaron rápidamente a los pozos, para evitar que dichos pozos se sequen, 100 μl del anticuerpo monoclonal H308 que fue previamente incubado con los haptenos fosforilados.

Como haptenos se emplearon fosforilcolina, glicerolfosforilcolina, fosforilserina, glicerolfosforilserina y fosforiletanolamina en cantidades de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 μmol . La estructura química de estos haptenos se presenta en la Figura 13. La fosforilcolina y la glicerolfosforilcolina forman parte de la región polar de la fosfatidilcolina, en tanto que la fosforilserina y la glicerolfosforilserina forman parte de la región polar de la fosfatidilserina; así como la fosforiletanolamina forma parte de la fosfatidiletanolamina.

Alícuotas de 100 µl del anticuerpo monoclonal H308 se incubaron con 100 µl de cada una de las soluciones de los haptenos durante 30 min a 30°C. Posteriormente se continuó el desarrollo del método del ELISA-liposomal como se describió anteriormente en el Ejemplo 1. Como segundo anticuerpo se usaron los anticuerpos de cabra anti-Fc de IgM de ratón conjugados a FITC.

5 Cuando se empleó fosforilcolina como hapteno para bloquear el anticuerpo H308, se observó una disminución de la reacción inmune de este anticuerpo con los antígenos liposomales que llevan partículas lipídicas, que llegó a un valor de absorbencia a 492 nm de 0.06, con 0.6 µmoles del hapteno (E, Fig. 14), lo que representa una inhibición de la reacción del 82% con respecto a la reacción en ausencia del hapteno (A, Fig. 14). Con glicerolfosforilcolina se obtuvo una
10 inhibición del 100% de la reacción inmune de este anticuerpo con los antígenos liposomales, con una concentración de 0.2 µmoles del hapteno (F, Fig. 14). En cambio los haptenos, glicerolfosforilserina (B, Fig. 14), fosforilserina (C, Fig. 14) y fosforiletanolamina (D, Fig. 14) no causaron inhibición de la reacción del anticuerpo monoclonal H308 con las partículas lipídicas de los liposomas.

15 La inhibición de la inmunorreacción con la fosforilcolina y la glicerolfosforilcolina indican que el sitio de reconocimiento del antígeno por el anticuerpo monoclonal H308 tiene subsitios que reconocen específicamente los grupos metilo de la colina, de los cuales carece la etanolamina y la serina (Fig. 13). Asimismo, la mayor inhibición de la inmunorreacción con glicerolfosforilcolina, sugiere que el sitio del antígeno en donde ocurre la reacción del anticuerpo H308 comprende
20 grupos químicos que llegan hasta el glicerol, lo cual esta de acuerdo con el modelo estructural propuesto para la partícula lipídica (Cullis y col., *op. cit.*, 1991) (Fig. 15), en donde los lípidos de la monocapa (C, Fig. 15) que recubren el arreglo molecular diferente a la bicapa (B, Fig. 15) están más separados que los lípidos de una monocapa normal (A, Fig. 15), y en ellos se expone una región que llega hasta el glicerol, que es la región con la cual reacciona el anticuerpo monoclonal
25 H308.

Posiblemente la parte central de la partícula, la región que se observa como micela invertida en B, Fig. 15, es formada por el lípido cónico, en tanto que las monocapas más abiertas que una monocapa normal que la recubren estarían formadas por la fosfatidilcolina y serían las regiones que identifican el anticuerpo H308. Si el anticuerpo monoclonal H308 reacciona
30 específicamente con una monocapa abierta de fosfatidilcolina, se explica la ausencia de inmunorreacción con los liposomas formados exclusivamente por fosfatidilcolina (G, Fig. 14), porque en estas vesículas los lípidos se encuentran en la asociación normal de monocapas que constituyen la bicapa, las cuales no son reconocidas por el anticuerpo monoclonal H308.

Ejemplo 6A. Detección de la inhibición de los anticuerpos anti-partículas lipídicas del suero de enfermos con el síndrome de antifosfolípidos con el hapteno glicerolfosforilcolina, por el método de ELISA-liposomal.

Estos estudios se llevaron a cabo con una modificación del método de ELISA-liposomal con los liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (relación molar 2:1) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), a pH 7, que contienen 0.1 μ mol de fosfatidato y que se incubaron con CaCl_2 5 mM como antígenos. Alícuotas de 100 μ l de los sueros de los pacientes, que se analizaron en los Ejemplos 1 y 2B, se incubaron con 100 μ l de la solución que contiene 0.4 μ moles de glicerolfosforilcolina durante 30 min a 30°C. Posteriormente los sueros se adicionaron a los antígenos liposomales en los pozos de la inmunoplaaca de ELISA y el método se continuó como se describió anteriormente en el Ejemplo 1. Como segundo anticuerpo se emplearon los anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG, IgM e IgA de humano conjugados a peroxidasa.

Con el hapteno glicerolfosforilcolina, a una concentración de 0.4 μ moles, se observó una disminución del 100% de la reacción de los anticuerpos de los sueros de los pacientes con los antígenos liposomales, en una forma similar a como se describió para la inhibición de la reacción del anticuerpo monoclonal H308 con dichos antígenos en las gráficas de la Figura 14 del Ejemplo 6.

Estos resultados confirman que los sueros de los enfermos con el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos estudiados, tienen anticuerpos anti-partículas lipídicas, con una especificidad similar a la del anticuerpo monoclonal H308, ya que fueron inhibidos en la misma proporción por el hapteno glicerolfosforilcolina .

Se hicieron estudios en ratones BALB/c en donde se administraron simultáneamente el anticuerpo monoclonal H308, que produce en estos ratones un cuadro parecido al síndrome de anticuerpos antifosfolípidos humano como se indicó en el Ejemplo 4C, y el hapteno glicerolfosforilcolina. Se administró 1 μ g del anticuerpo monoclonal H308 una vez por semana, por vía intraperitoneal por ocho semanas, y simultáneamente se administró el hapteno glicerolfosforilcolina a dosis de 2.5 mg/Kg de peso, por vía intravenosa, cada 24 hs, durante las ocho semanas. Con este tratamiento se inhibió en un 40% de dichos ratones el efecto de los anticuerpos en el desarrollo del cuadro patológico.

De acuerdo con lo anterior la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco inhibidor glicerolfosforilcolina es de 2.5 mg/Kg de peso.

Ejemplo 7. Detección de la estabilización de membranas liposomales que impide la formación de partículas lipídicas y la unión posterior de anticuerpos anti-partículas lipídicas, por el método de citofluorometría liposomal.

Estos estudios se llevaron a cabo con una modificación del método de citofluorometría liposomal, con liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato de yema de huevo (relación molar 2:1) que contienen 0.1 μmol de fosfatidato y que llevan partículas lipídicas inducidas por el fármaco inductor cloropromacina 0.2 mM y que están suspendidos en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), a pH 7. Se estudió la agregación de estos liposomas, así como la complejidad de sus bicapas lipídicas por citofluorometría en el citómetro FACScalibur, equipado con rayo láser de argón de 488 nm (Beckton Dickinson). El análisis de 10,000 liposomas se hizo en escala logarítmica con los siguientes detectores: FSC en EOO, con un tamaño mínimo de detección de liposomas a 52 V y SSC de 401 V (Baeza y col., *op. cit.*, 1995). Los datos obtenidos se analizaron con el programa Cellquest (Beckton Dickinson).

Inmediatamente después de la adición del fármaco inductor, los liposomas se incubaron con diferentes concentraciones de los fármacos estabilizadores de la bicapa lipídica espermidina o cloroquina. Esta mezcla se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente y se analizó por citofluorometría.

En la Figura 16 se presentan las gráficas de agregación liposomal (FSC) y de complejidad de la bicapa liposomal (SSC) que se obtuvieron en estos estudios. Como controles negativo y positivo de la presencia de partículas lipídicas en los liposomas, se muestran las gráficas de los liposomas solos en el regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), a pH 7 (A, Fig. 16), así como de los liposomas incubados con el fármaco inductor cloropromacina 200 μM (B, Fig. 16), en este último caso se observa claramente el aumento de 100 veces en los valores de SSC, así como de un aumento en la agregación liposomal, con respecto a los liposomas solos (A, Fig. 16). El aumento en estos valores indica la presencia de las partículas lipídicas inducidas por el fármaco inductor cloropromacina, así como una agregación de estos liposomas.

También se presentan como controles, las gráficas correspondientes a los liposomas que fueron tratados directamente con los fármacos estabilizadores de la bicapa lipídica espermidina (C, Fig. 16) o cloroquina (D, Fig. 16). En ambos casos se observa que las gráficas obtenidas fueron prácticamente iguales a las de los liposomas solos en el regulador de pH de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), a pH 7 (A, Fig. 16). Sin embargo, cuando los liposomas se incubaron simultáneamente con el fármaco inductor de partículas lipídicas cloropromacina y con los fármacos estabilizadores de la bicapa lipídica, espermidina (E, F, Fig. 16) o cloroquina (G, H, Figs. 16), no hubo la formación de partículas lipídicas en ellos, ni la agregación liposomal. Puede observarse que los valores de SSC y de FSC obtenidos para estos liposomas (E-H, Fig. 16) fueron muy similares a los de los liposomas solos, con valores de SSC menores a 100, a diferencia de la gráfica que indica la presencia de partículas lipídicas, con valores de SSC mayores de 1000 (B, Fig. 16).

Estos estudios mostraron que la espermidina es efectiva en estabilizar la bicapa lipídica a concentraciones de 5 μM , esta concentración bloquea la formación de partículas lipídicas inducidas

por cloropromacina a concentraciones de 0.2 mM y 0.6 mM, respectivamente (E, F, Fig. 16). Para la cloroquina, las concentraciones efectivas son aun menores, ya que este fármaco produjo la estabilización de las membranas a una concentración de 0.1 μ M, cuando se usaron las concentraciones de 0.2 mM y 0.6 mM, respectivamente, del fármaco inductor de partículas lipídicas cloropromacina (G, H, Fig. 16).

Al emplear los liposomas incubados con ambos fármacos, el inductor de partículas lipídicas y el estabilizador de la bicapa lipídica, como antígenos con el anticuerpo monoclonal H308 anti-partículas lipídicas, no hubo reacción inmune, porque las gráficas de fluorescencia que se obtuvieron fueron como aquellas correspondientes a los liposomas solos en g, Fig. 3D; y h, Fig. 3D, del Ejemplo 2A, y no como las que indican la reacción del anticuerpo monoclonal con las partículas lipídicas liposomales en b, Fig. 3^a; y d, Fig. 3B, del Ejemplo 2A, que se emplearon como un control positivo en este experimento.

Estos resultados indican que las membranas liposomales fueron estabilizadas por su interacción con los fármacos estabilizadores de bicapas lipídicas, espermidina o cloroquina, por lo que no presentan partículas lipídicas y por lo tanto no reaccionan con el anticuerpo monoclonal H308 anti-partículas lipídicas.

Ejemplo 7A. Detección de la estabilización de membranas celulares que impide la formación de partículas lipídicas y la unión posterior de anticuerpos anti-partículas lipídicas.

Estos estudios se llevaron a cabo con el método de citofluorometría, con células Ag4 de mieloma de ratón que llevan partículas lipídicas inducidas por el fármaco inductor cloropromacina 0.2 mM y que están suspendidas en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 135 mM), a pH 7, que contiene glucosa 11 mM. La agregación de estas células, así como la complejidad de sus bicapas lipídicas membranales se analizó por citofluorometría en el citómetro FACScalibur, equipado con rayo láser de argón de 488 nm (Beckton Dickinson). El análisis de 10,000 células se hizo con los siguientes detectores: FSC de EOO en modo lineal, con una ganancia de 2 V, con un tamaño mínimo de detección de células a 52 V, y SSC de 250 V en escala logarítmica (Baeza y col., *op. cit.*, 1995). Los datos obtenidos se analizaron con el programa Cellquest (Beckton Dickinson).

Inmediatamente después de la adición del fármaco inductor, las células se incubaron con diferentes concentraciones de los fármacos estabilizadores de la bicapa lipídica espermidina o cloroquina. Esta mezcla se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente y se analizó por citofluorometría.

Los resultados obtenidos fueron similares a los descritos en las gráficas de la Figura 16 del Ejemplo 7, tanto para los controles, como para las células tratadas con ambos fármacos, el inductor de partículas lipídicas y el estabilizador de la bicapa lipídica.

Además, cuando las células tratadas con ambos fármacos se emplearon como antígenos con el anticuerpo monoclonal H308 anti-partículas lipídicas, no hubo reacción inmune con dicho anticuerpo; porque las gráficas de fluorescencia que se obtuvieron fueron como aquellas correspondientes a las células solas y no como las que indican la reacción del anticuerpo monoclonal con las partículas lipídicas liposomales en b, Fig. 3 A, del Ejemplo 2A, que se emplearon como un control positivo en este experimento.

Estos resultados indican que las membranas celulares de las células Ag4 fueron estabilizadas por su interacción con los fármacos estabilizadores de bicapas lipídicas, espermidina o cloroquina, por lo que no presentan partículas lipídicas y por lo tanto no reaccionan con el anticuerpo monoclonal H308 anti-partículas lipídicas.

Ejemplo 7B. Detección de la reversión de las partículas lipídicas por los fármacos estabilizadores de bicapas lipídicas.

Se repitieron los Ejemplos 7 y 7A utilizando como antígenos los liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (relación molar 2:1) en regulador de Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), a pH 7, o el cultivo de células Ag4, los cuales fueron incubados con el fármaco inductor cloropromacina 0.2 mM durante 30 min a temperatura ambiente antes del tratamiento con el fármaco estabilizador, espermidina o cloroquina.

Al analizar estos antígenos por citofluorometría, se observó que las partículas lipídicas y la agregación causada por el fármaco inductor cloropromacina, que dieron gráficas como la de la B, Fig. 16, del Ejemplo 7, fueron revertidas por los fármacos estabilizadores espermidina o cloroquina. Esta reversión, en donde se deshacen las partículas lipídicas dio origen a gráficas como las mostradas en las E, F, G, y H, Fig. 16, del Ejemplo 7.

La reacción posterior de estos antígenos, liposomales o celulares, en donde se hizo la reversión de las partículas lipídicas, con el anticuerpo monoclonal H308 fue negativa, debido a la ausencia de estas estructuras lipídicas.

Estos experimentos indican que los fármacos espermidina y cloroquina tienen la acción de impedir la formación de las partículas lipídicas, pero además pueden deshacer las partículas ya formadas, lo cual es muy importante para la aplicación de estos fármacos estabilizadores en el tratamiento de enfermedades en humanos en las que participan las partículas lipídicas y/o anticuerpos anti-partículas lipídicas.

Se hicieron estudios en ratones BALB/c en donde se administraron simultáneamente el anticuerpo monoclonal H308, que produce en estos ratones un cuadro parecido al síndrome de anticuerpos antifosfolípidos humano como se indicó en el Ejemplo 4C, y uno de los fármacos estabilizadores de membranas, la espermidina o la cloroquina. Se administró 1 µg del anticuerpo monoclonal H308 una vez por semana, por vía intraperitoneal, por ocho semanas, y

simultáneamente se administró el fármaco estabilizador de membranas cloroquina a dosis de 250 mg/Kg de peso, por vía oral, cada 24 hs, durante las ocho semanas. Con este tratamiento se retardó notablemente el desarrollo del cuadro patológico en los ratones. Posiblemente al modificar las dosis de los fármacos estabilizadores que se aplican a los ratones, se logre impedir el desarrollo de la enfermedad. La dosis de cloroquina usada es similar a la que se emplea en humanos como un fármaco en el tratamiento de la artritis reumatoide y del lupus eritematoso generalizado.

La espermidina se usó, como clorhidrato, en dosis de 1 mg/Kg de peso, por vía intraperitoneal, cada 24 hs, durante ocho semanas, con lo cual se obtuvieron resultados semejantes a los descritos con la cloroquina.

De acuerdo con lo anterior la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco estabilizador de las membranas celulares cloroquina es de 250 mg/Kg de peso y de la espermidina es de 1 mg/Kg de peso.

De conformidad con lo anteriormente descrito, se podrá observar que el uso de los anticuerpos obtenidos a partir de estructuras lipídicas diferentes a la bicapa para determinar estados fisiológicos celulares y para el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades ha sido ideado para permitir una detección temprana de enfermedades relacionadas con anticuerpos antifosfolípidos y, como consecuencia, un tratamiento para prevenir, detener y revertir dicha enfermedad; y será evidente para cualquier experto en la materia que las modalidades que aquí se presentan, son únicamente ilustrativas y no deberán interpretarse en forma limitativa de la presente invención, ya que son posibles numerosos cambios en sus detalles y particularidades, sin apartarse del alcance de la invención.

Aún cuando se han ilustrado y descrito modalidades específicas de la invención, debe hacerse hincapié en que son posibles otras numerosas modificaciones a la misma, como pueden ser el uso de diferentes cepas de ratones, lípidos para obtener los liposomas, métodos de inmunización y métodos de obtención de hibridomas, diversos reactivos para el kit de diagnóstico y/o diversas enfermedades relacionadas con anticuerpos antifosfolípidos. Por lo tanto, la presente invención no deberá considerarse como restringida excepto por lo que exija la técnica anterior y por el espíritu de las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de diagnóstico para determinar si un sujeto que presenta características clínicas indicativas del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario o de enfermedades asociadas al síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario, y que aún no presenta anticuerpos anti-cardiolipina, anticoagulante lúpico, anti-ADN o anti-nucleares, tiene una enfermedad relacionada con la presencia de anticuerpos antifosfolípidos; el cual comprende las etapas de detectar de manera directa o indirecta la presencia o ausencia de partículas lipídicas en una muestra del sujeto; y observar si las partículas lipídicas son o no detectadas, en donde la presencia de dichas partículas lipídicas indica que el sujeto está desarrollando una enfermedad relacionada con la presencia de anticuerpos antifosfolípidos.
2. Un método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la detección se lleva a cabo en forma indirecta mediante el uso de un antígeno que contiene partículas lipídicas que se hacen reaccionar con una muestra del sujeto a fin de determinar si dicha muestra contiene anticuerpos anti-partículas lipídicas; y en donde dicha determinación se lleva a cabo a través de un protocolo seleccionado del grupo formado por citofluorometría, inmunofluorescencia y ELISA.
3. Un método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la muestra del sujeto se selecciona de entre suero y plasma del paciente; y el antígeno que contiene partículas lipídicas se selecciona de entre células neoplásicas y liposomas.
4. Un método de conformidad con la reivindicación 1, incluyendo además la etapa de hacer reaccionar con el antígeno por lo menos un anticuerpo policlonal o monoclonal anti-partículas lipídicas, para confirmar la presencia o no de los anticuerpos anti-partículas lipídicas en la muestra del sujeto.
5. Un método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la detección se lleva a cabo en forma directa haciendo reaccionar células del sujeto con por lo menos un anticuerpo policlonal o monoclonal anti-partículas lipídicas; y en donde dicha detección se lleva a cabo a través de un protocolo seleccionado del grupo formado por inmunofluorescencia, citofluorometría y ELISA.
6. Un kit de diagnóstico para la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en una muestra de un sujeto con una enfermedad relacionada con anticuerpos antifosfolípidos, el cual comprende:
- a) un reactivo indicador que incluye, primero, cuando menos liposomas con partículas lipídicas y, segundo, cuando menos un anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas;
 - b) cuando menos una solución de bloqueo para evitar posibles resultados falsos positivos;
 - c) cuando menos una solución reguladora de pH, como medio para permitir la reacción de la muestra procedente del sujeto enfermo con dicho reactivo indicador; y
 - d) medios enzimáticos para hacer evidente dicha reacción;

7. Un kit de diagnóstico para la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en una muestra de un sujeto con una enfermedad relacionada con anticuerpos antifosfolípidos, de conformidad con la reivindicación 6, en donde los medios enzimáticos comprenden anticuerpos conjugados a una enzima seleccionada del grupo formado por peroxidasa y fosfatasa alcalina.
- 5 8. Un kit de diagnóstico de conformidad con la reivindicación 7, en donde la muestra del sujeto se selecciona de entre suero y plasma del sujeto.
9. Un kit de diagnóstico de conformidad con la reivindicación 8, incluyendo además cuando menos una muestra de suero valorado procedente de un individuo sano, como control negativo de la reacción con los antígenos liposomales que portan partículas lipídicas.
- 10 10. Un kit de diagnóstico de conformidad con la reivindicación 9, incluyendo además medios para llevar a cabo la reacción, del tipo de las inmunoplasacas.
11. Un kit de diagnóstico para la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en una muestra de un sujeto con una enfermedad relacionada con anticuerpos antifosfolípidos, el cual comprende:
 - 15 a) un reactivo indicador que comprende liposomas con partículas lipídicas;
 - b) cuando menos una solución reguladora de pH, como medio para permitir la reacción de la muestra procedente del sujeto enfermo con dicho reactivo indicador; y
 - c) medios fluorescentes para hacer evidente dicha reacción;
12. Un kit de diagnóstico para la detección de anticuerpos anti-partículas lipídicas en una muestra de un sujeto con una enfermedad relacionada con anticuerpos antifosfolípidos, de conformidad con la reivindicación 11, en donde los medios fluorescentes comprenden anticuerpos conjugados a un fluorocromo seleccionado del grupo formado por isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, Cy3 y Percp.
- 20 13. Un kit de diagnóstico, de conformidad con la reivindicación 12, en donde la muestra del sujeto se selecciona de entre suero y plasma del sujeto.
- 25 14. Un kit de diagnóstico de conformidad con la reivindicación 13; incluyendo además cuando menos un anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas, como control positivo de reacción con antígenos liposomales; y cuando menos una muestra de suero valorado procedente de un individuo sano, como control negativo de la reacción con los antígenos liposomales que portan partículas lipídicas.
- 30 15. Un kit de diagnóstico de conformidad con la reivindicación 14; incluyendo además medios para llevar a cabo la reacción, del tipo de los tubos de centrifugación.
16. Un kit de diagnóstico para la detección directa de partículas lipídicas en una muestra de un sujeto con una enfermedad relacionada con anticuerpos antifosfolípidos, el cual comprende:
 - 35 a) un reactivo indicador consistente en cuando menos un anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas;

- b) cuando menos una solución reguladora de pH, como medio para permitir la reacción de la muestra procedente del enfermo con dicho reactivo indicador; y
- c) medios fluorescentes para hacer evidente dicha reacción;

- 5 17. Un kit de diagnóstico para la detección directa de partículas lipídicas en una muestra de un sujeto con una enfermedad relacionada con anticuerpos antifosfolípidos, de conformidad con la reivindicación 16, en donde los medios para hacer evidente dicha reacción comprenden medios enzimáticos.
- 10 18. Un kit de diagnóstico de conformidad con las reivindicaciones 16 o 17, en donde los medios fluorescentes y los medios enzimáticos comprenden anticuerpos conjugados a un fluorocromo o a una enzima, respectivamente.
- 15 19. Un kit de diagnóstico para la detección directa de partículas lipídicas en una muestra de un sujeto con una enfermedad relacionada con anticuerpos antifosfolípidos, de conformidad con la reivindicación 18, en donde el fluorocromo se selecciona del grupo formado por isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, Cy3 y Percp; y la enzima se selecciona del grupo formado por peroxidasa y fosfatasa alcalina.
- 20 20. Un kit de diagnóstico de conformidad con la reivindicación 19, en donde la muestra del sujeto se selecciona de entre células de órganos de dicho sujeto.
21. Un kit de diagnóstico de conformidad con la reivindicación 20, incluyendo además medios para llevar a cabo la reacción, del tipo de placas para cultivo celular.
- 25 22. Un método para el tratamiento de un sujeto que presenta características clínicas del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario o de enfermedades asociadas al síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario, que aún no presenta anticuerpos anti-cardiolipina, anticoagulante lúpico, anti-ADN o anti-nucleares y con una titulación de anticuerpos anti-partículas lipídicas ≤ 5 Unidades Arbitrarias; el cual comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco estabilizador de la membrana celular.
- 30 23. Un método de conformidad con la reivindicación 22, en donde el fármaco estabilizador se selecciona del grupo formado por poliaminas del tipo de la putrescina, espermidina y espermina; y del grupo formado por los antimaláricos del tipo de la cloroquina, hidrocloroquina, amodiaquina, quinacina y primaquina.
- 35 24. Un método para el tratamiento de un sujeto que presenta características clínicas del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos primario o de enfermedades asociadas al síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario, y que presenta o no anticuerpos anti-cardiolipina, anticoagulante lúpico, anti-ADN o anti-nucleares, y con una titulación de anticuerpos anti-partículas lipídicas > 5 Unidades Arbitrarias; el cual comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco inhibidor de anticuerpos anti-partículas

lipídicas; seguida de la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco estabilizador de la membrana celular.

25. Un método de conformidad con la reivindicación 24, en donde el fármaco inhibidor de anticuerpos anti-partículas lipídicas se selecciona del grupo formado por haptenos fosforilados del tipo de la fosforilcolina y glicerolfosforilcolina; y el fármaco estabilizador se selecciona del grupo formado por poliaminas del tipo de la putrescina, espermidina y espermina; y del grupo formado por los antimaláricos del tipo de la cloroquina, hidrocloroquina, amadoquina, quinacina y primaquina.

26. Un método para la determinación de los diferentes estados fisiológicos celulares, caracterizado porque comprende la detección de partículas lipídicas en las membranas de dichas células.

27. Un kit de detección de los diferentes estados fisiológicos celulares en una muestra de células, el cual comprende:

- a) un reactivo indicador consistente en cuando menos un anticuerpo monoclonal anti-partículas lipídicas;
- b) cuando menos una solución reguladora de pH, como medio para permitir la reacción de las células en los diferentes estados fisiológicos con dicho reactivo indicador; y
- c) medios fluorescentes o enzimáticos para hacer evidente dicha reacción;

28. Un kit de detección de conformidad con la reivindicación 27, en donde los medios fluorescentes y los medios enzimáticos comprenden anticuerpos conjugados a un fluorocromo o a una enzima, respectivamente.

29. Un kit de detección de conformidad con la reivindicación 28, en donde el fluorocromo se selecciona del grupo formado por isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, Cy3 y Percp; y la enzima se selecciona del grupo formado por peroxidasa y fosfatasa alcalina.

30. Un kit de detección de los diferentes estados fisiológicos celulares en una muestra de células, de conformidad con la reivindicación 29, en donde las células de la muestra se seleccionan del grupo formado por células aisladas y células en cortes de órganos de un sujeto humano o no humano.

31. Un kit de detección de conformidad con la reivindicación 30, incluyendo además medios para llevar a cabo dicha reacción, del tipo de cajas para cultivo celular.

EXTRACTO DE LA DESCRIPCIÓN

- 5 Se describen métodos para la detección tanto de anticuerpos anti-partículas lipídicas como de partículas lipídicas en membranas celulares para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos. También se describen kits o equipos para llevar a la práctica dicho diagnóstico. Asimismo se describen métodos para el tratamiento de enfermedades asociadas al síndrome de anticuerpos antifosfolípidos. Además, se describen métodos para la detección de los diferentes estados fisiológicos que pueden presentar las células, así como los kits que se requieran para dicha detección.

004080" 52/22 560

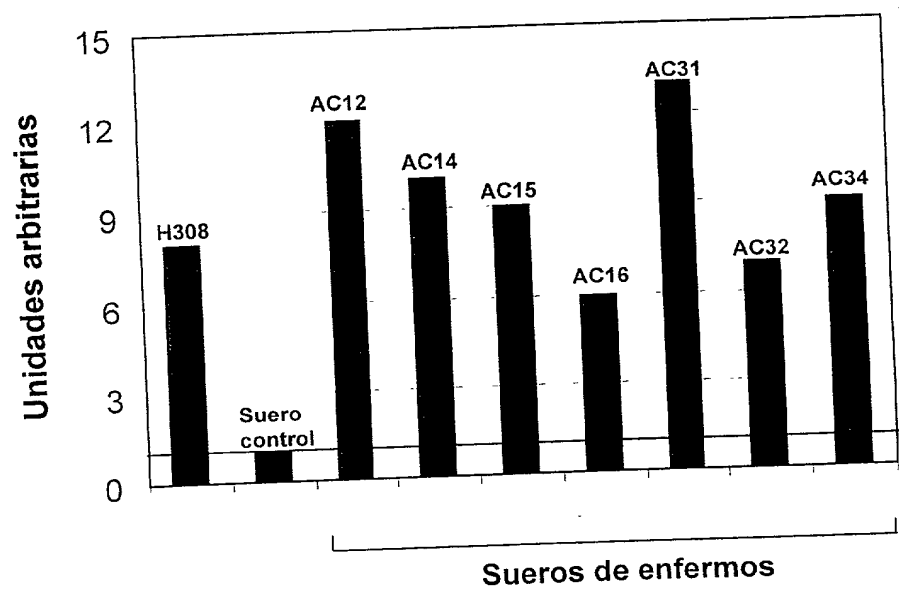


Figura 1

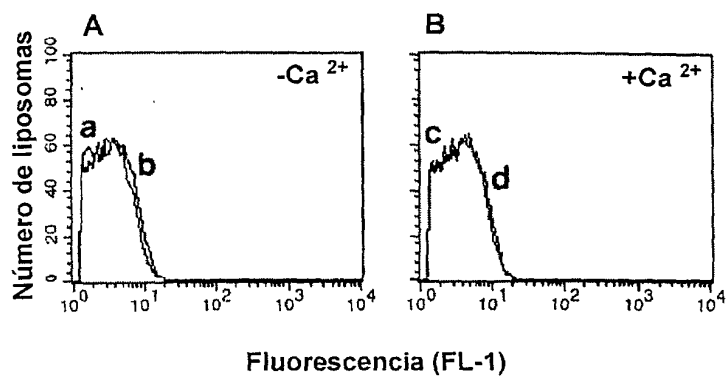


Figura 2.

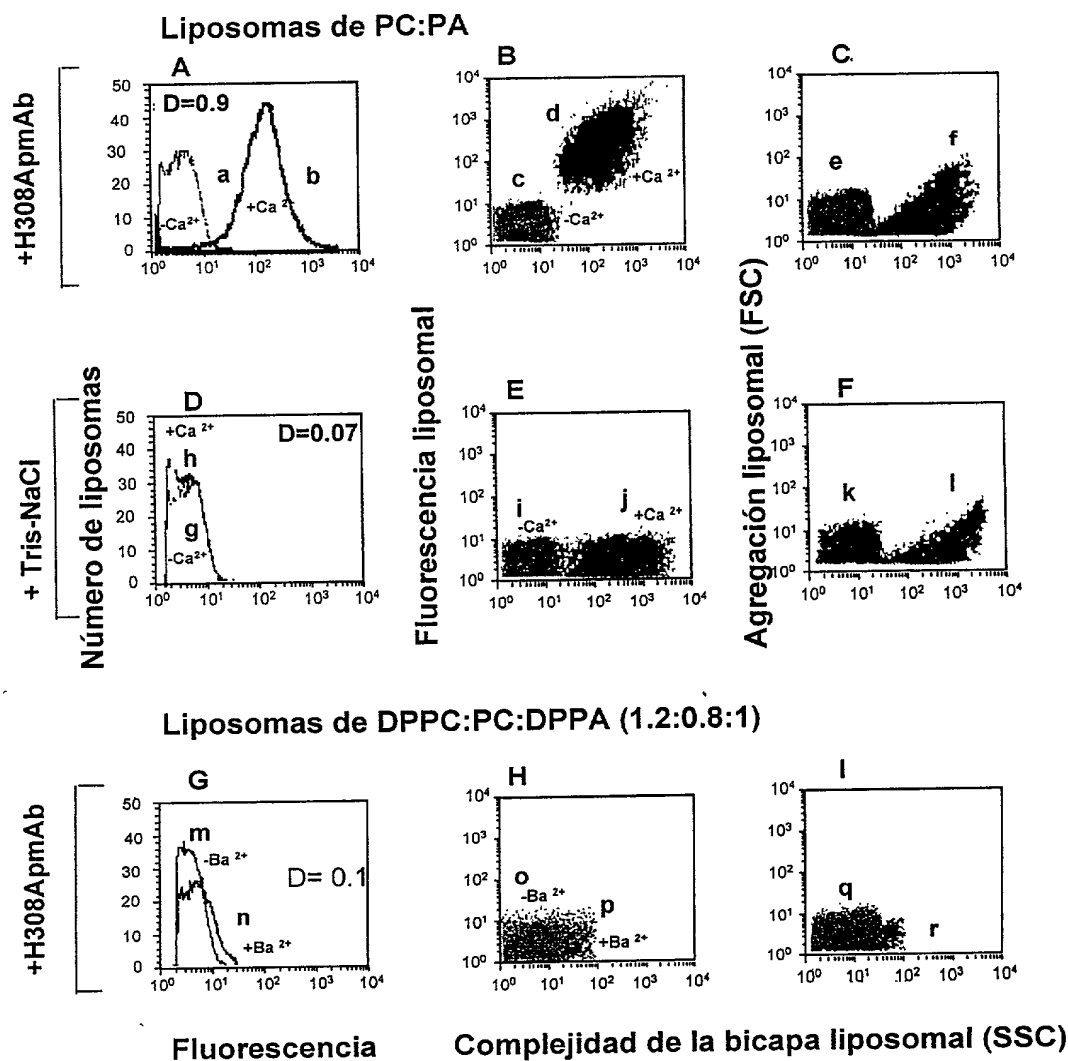


Figura 3

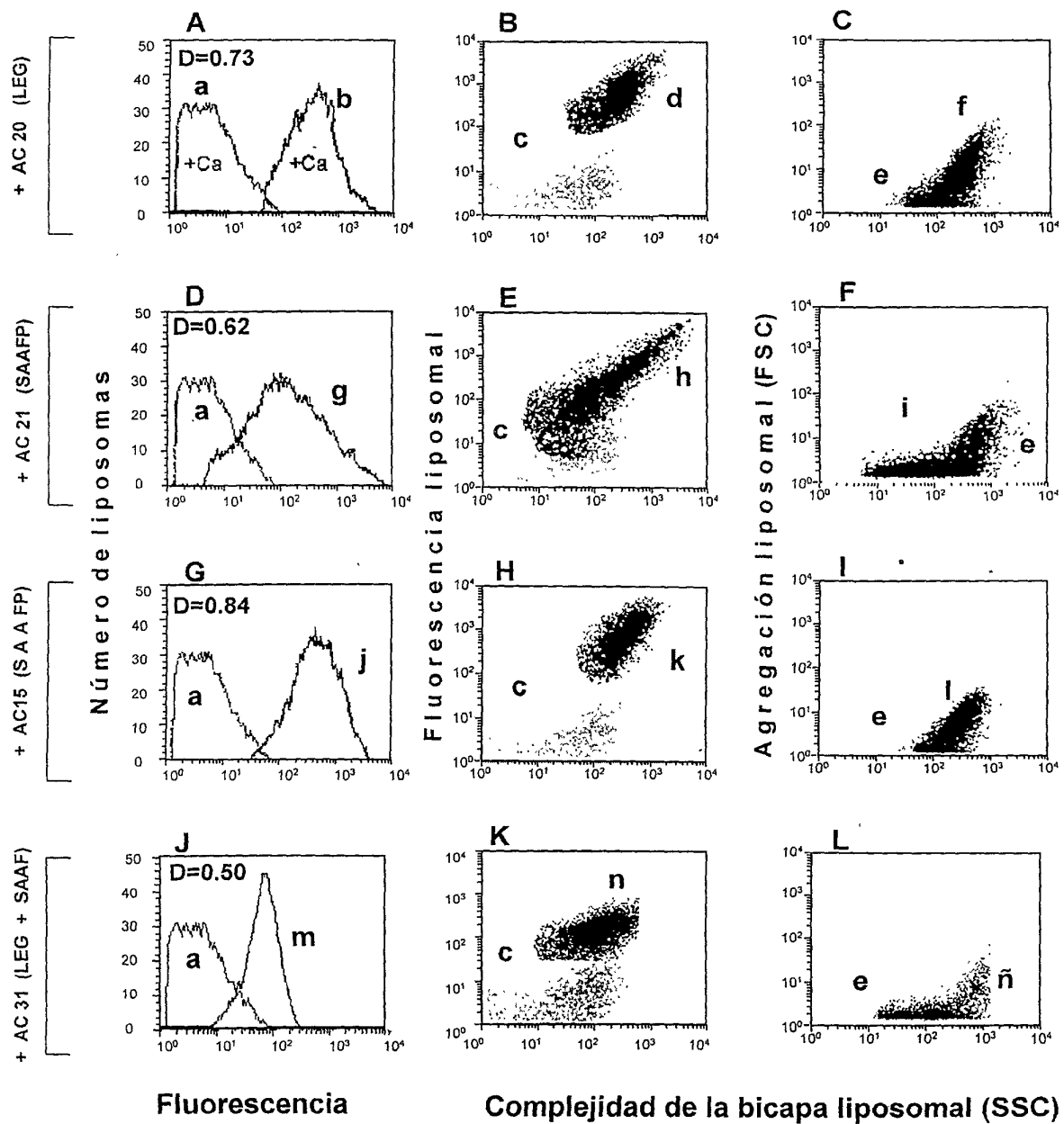


Figura 4 A

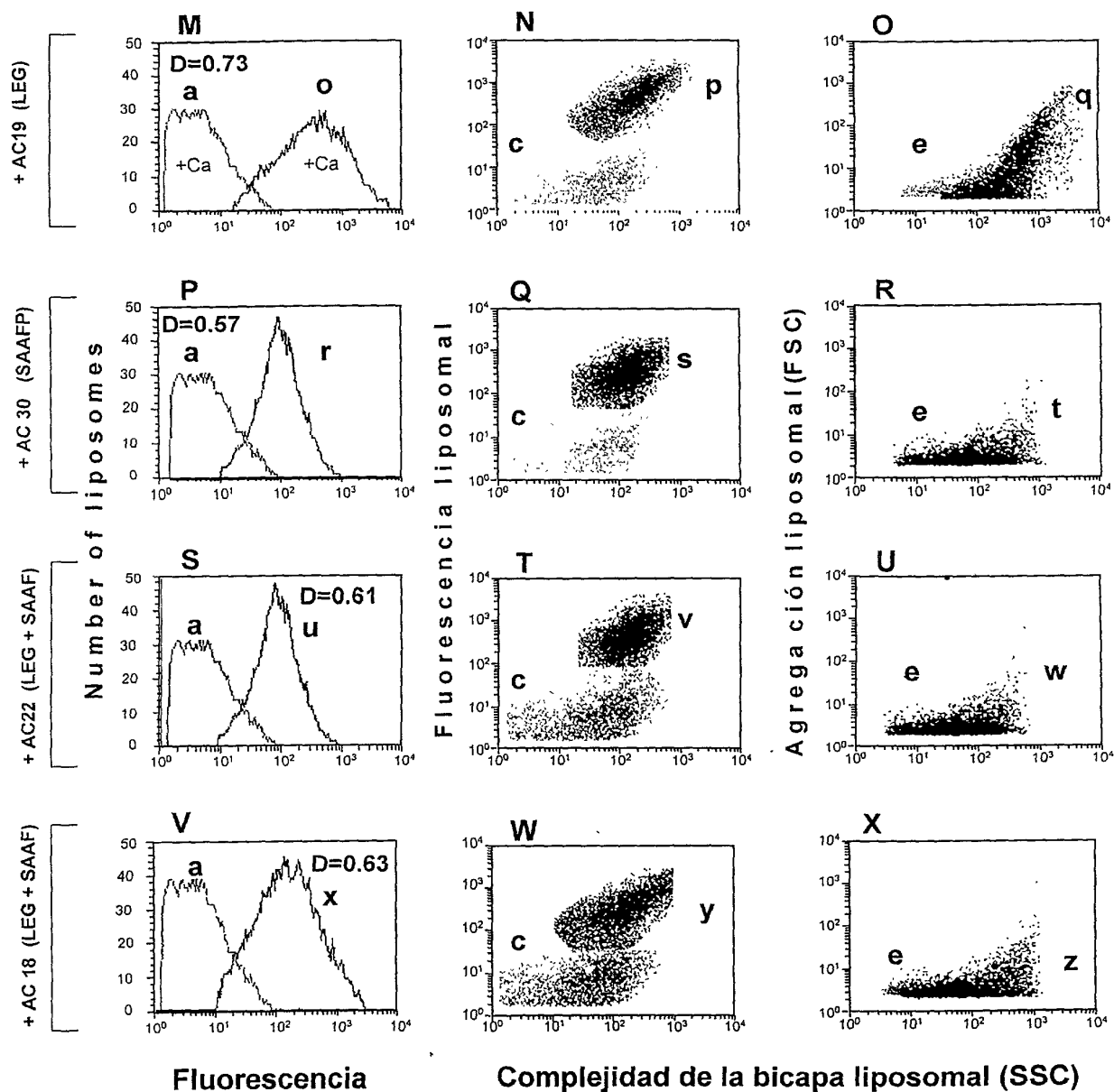


Figura 4 B

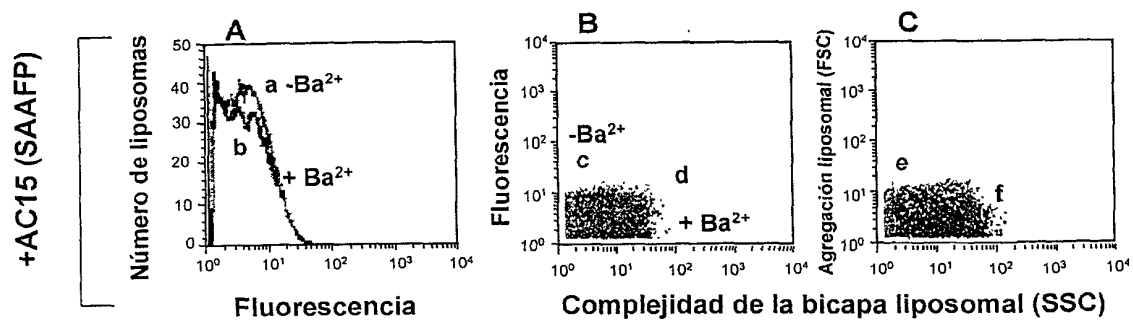


Figura 5

004080" 5E 2E 560

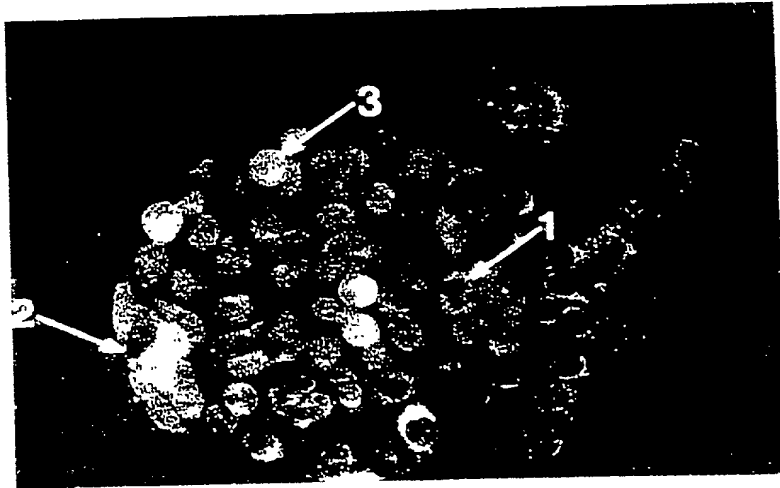


Figura 6

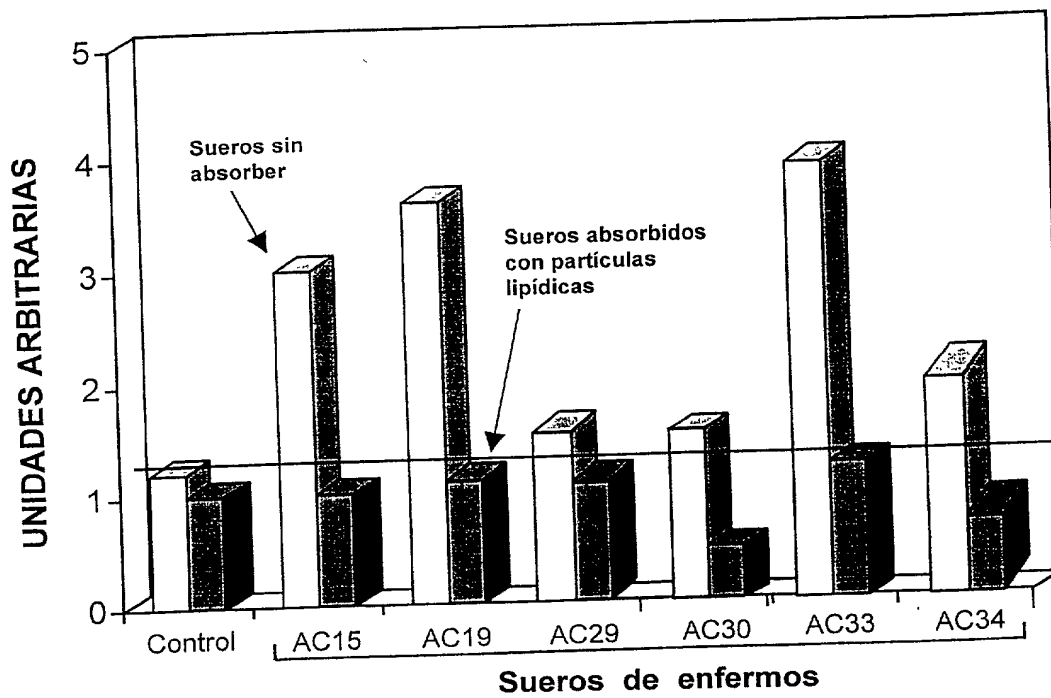


Figura 7

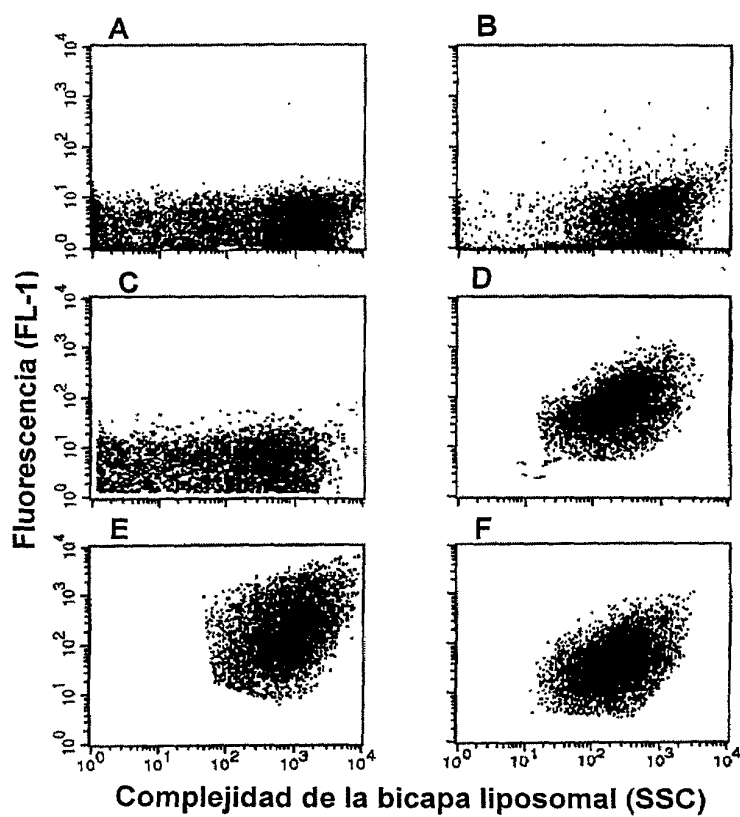


Figura 8

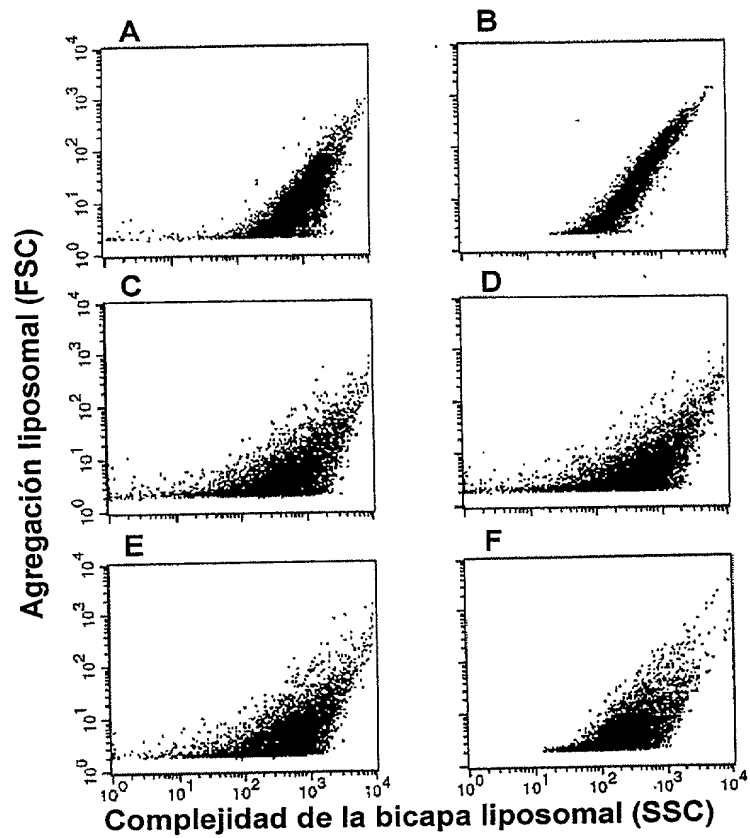


Figura 9

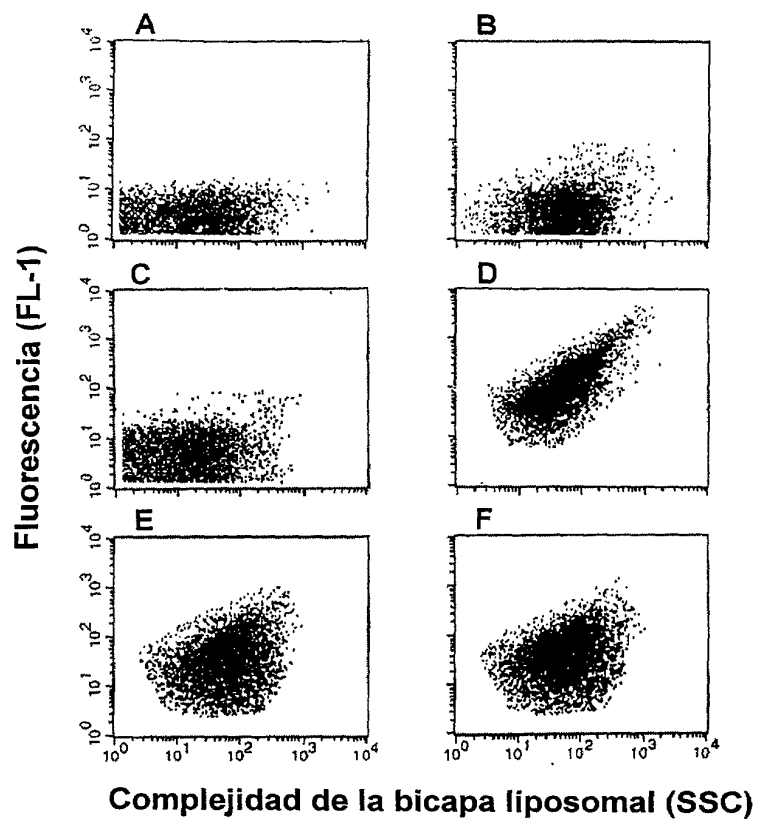


Figura 10



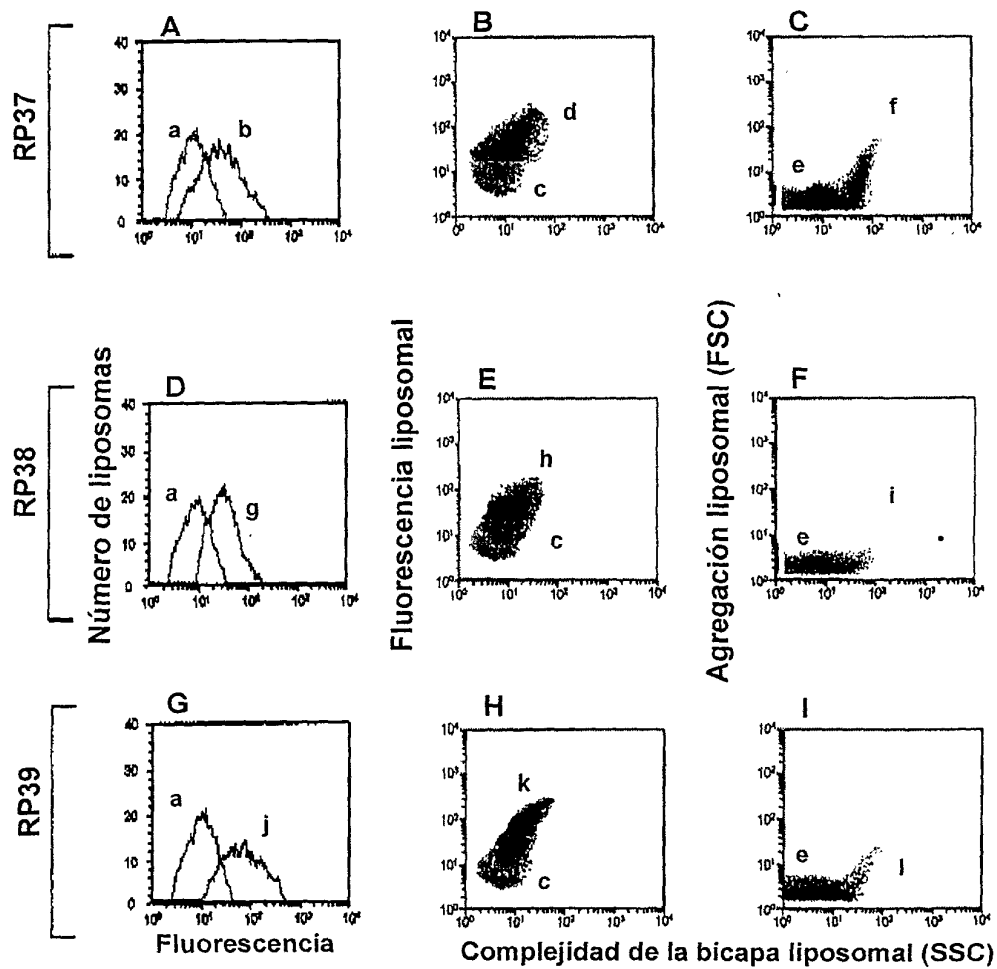
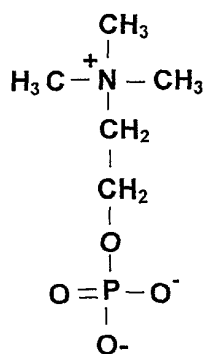
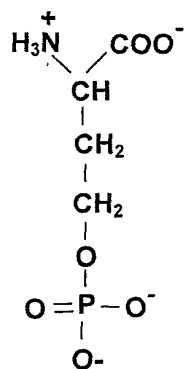


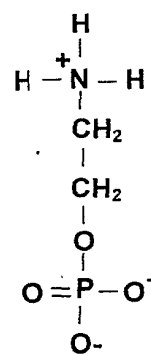
Figura 12



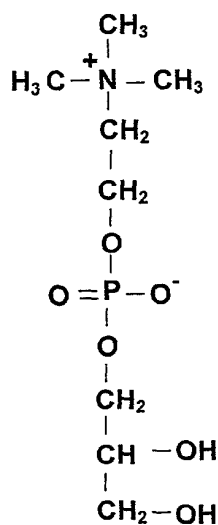
Fosforilcolina



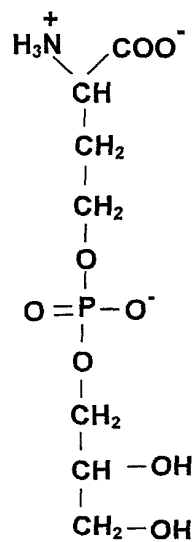
Fosforilserina



Fosforiletanolamina



Glicerolfosforilcolina



Glicerolfosforilserina

Figura 13

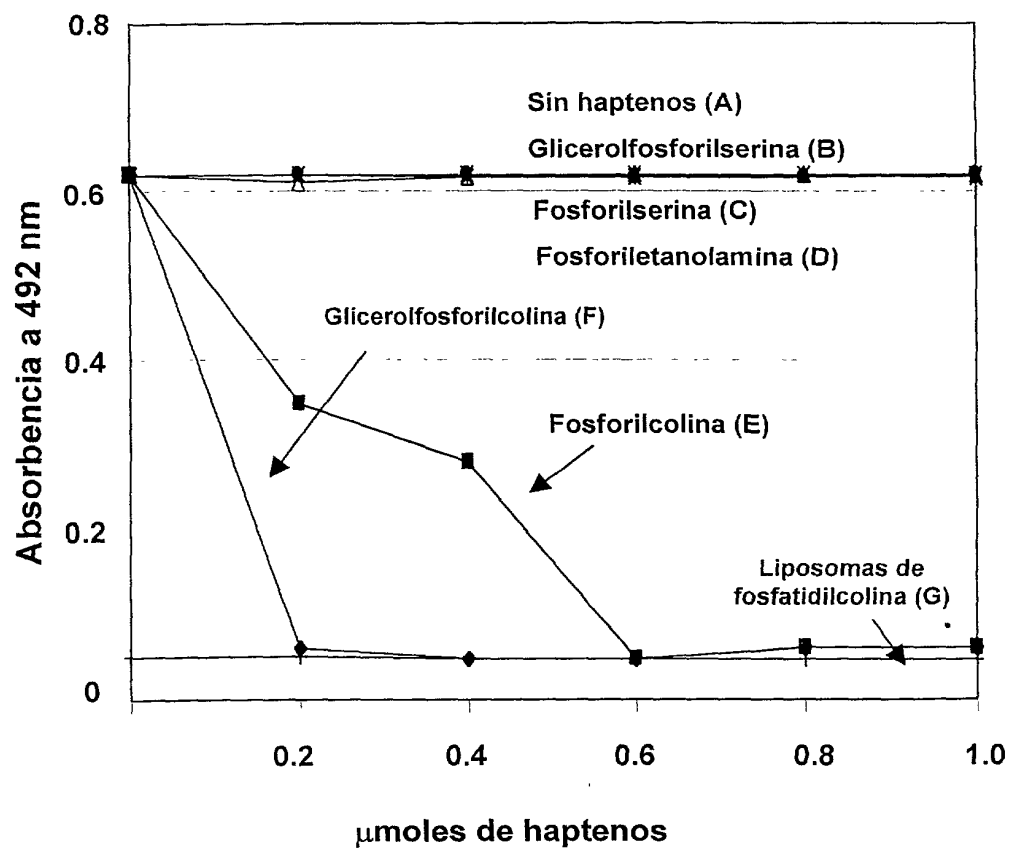


Figura 14

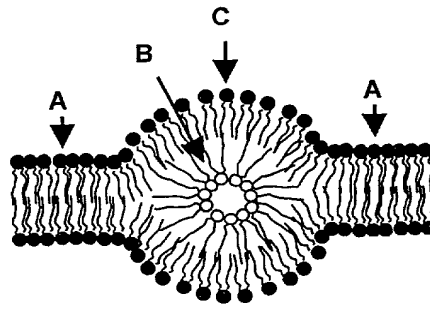


Figura 15

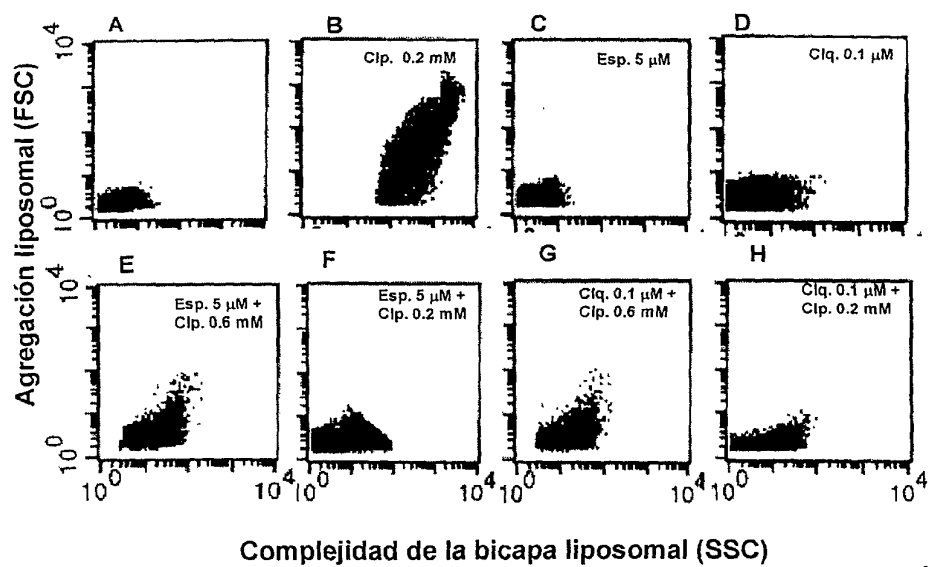


Figura 16